

Untersuchung Sphingosin-1-Phosphat-induzierter
Signalwege und ihrer Bedeutung für die Migration
humaner Endothelzellen

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt dem Rat der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Diplom-Biochemiker Gunter Ehrlich

geboren am 23.09.1974 in Jena

Gutachter:

1. Prof. Dr. Reinhard Wetzker, Friedrich-Schiller-Universität Jena
2. Prof. Dr. Claus Liebmann, Friedrich-Schiller-Universität Jena
3. Prof. Dr. Heinrich Sauer, Justus-Liebig-Universität Giessen

Tag der öffentlichen Disputation: 25.05.2009

Zusammenfassung

Endothelzellen bilden die innere Zellschicht der Blutgefäße, die hauptverantwortlich für die Blutversorgung aller Gewebe höherer Organismen sind. Die Bildung neuer Gefäße aus Endothelzellen bereits bestehender Gefäße wird als Angiogenese bezeichnet. Dieser Vorgang ist essentiell für Wachstums- und Wundheilungsprozesse, fördert aber auch die Pathogenese von Tumorerkrankungen und chronisch entzündlichen Prozessen. Die Entschlüsselung der angiogenen Signalwege ist daher von großem medizinischem Interesse. Sie ebnet den Weg für die Entwicklung neuer Therapiemethoden zur Behandlung pathologischer Formen der Angiogenese.

Die Bildung neuer Gefäße durch seitliche Aussprossung von Kapillaren beginnt mit der lokalen Aktivierung von Endothelzellen durch verschiedene lösliche Signalstoffe, darunter bioaktive Lipide wie Sphingosin-1-Phosphat (S1P). Infolgedessen lösen sich die Endothelzellen voneinander, aktivieren Proteasen zum Abbau der extrazellulären Matrix, proliferieren und migrieren ins umliegende Gewebe, um dort neue Kapillargefäße zu generieren.

Die Migration der Endothelzellen ist als essentieller Teilprozeß der Angiogenese ein interessantes Target für die biomedizinische Forschung. Der Prozeß der Migration erfordert zyklische Veränderungen der Zelle, die zu Ablösung von der Matrix, Vorwärtsbewegung und Readhäsion führen und durch ein komplexes Netzwerk an Signalen reguliert werden. Voraussetzung für die Migration sind die dynamische Polarisierung von Signalmolekülen und die Reorganisation des Zytoskeletts, mit denen die Zelle auf einen chemotaktischen Stimulus reagiert.

Das Phospholipid S1P ist ein potenter Stimulus für die Migration von Endothelzellen, dessen Relevanz in pathologischen Angiogeneseprozessen gezeigt wurde. S1P stimuliert Endothelzellen über die Bindung an die G-protein-gekoppelten Rezeptoren S1P₁ und S1P₃. Die Mechanismen der S1P-induzierten Migration sind jedoch noch nicht ausreichend aufgeklärt. Nach Literaturdaten sind Phosphoinositid-3-Kinasen (PI3Ks), Akt, die endotheliale NO-Synthase (eNOS), Rac und die extrazellulärsignal-regulierten Kinasen 1 und 2 (ERK1/2) als verantwortliche Signalmoleküle in die Regulation der Migration einbezogen. Der Beitrag der einzelnen Signalwege, die Interaktionen zwischen den Signalmolekülen und die Funktionen einzelner Isoformen der Signalproteine sind bisher jedoch wenig charakterisiert und wurden in der vorliegenden Arbeit untersucht. Im Mittelpunkt stand dabei die Untersuchung der Rolle von G_i-Protein-sensitiven PI3K-Isoformen (PI3K β und PI3K γ) als Vermittler von Signalen, die durch S1P₁ und S1P₃ ausgelöst werden und zur Migrationsantwort beitragen.

Die Experimente wurden an kultivierten humanen Umbilikalvenen-Endothelzellen (HUVEC) durchgeführt. Um die Rolle einzelner Signalproteine aufzuklären, wurden spezifische Inhibitoren (TGX-221 für PI3K β , AS-252424 für PI3K γ , NSC-23766 für Rac1, Akt1/2-Inhibitor für Akt und L-NAME für eNOS) eingesetzt. Zudem wurde die RNA-Interferenz-Technologie angewendet, um die Expression von PI3K β und PI3K γ herunterzuregulieren. Dazu mußten passende *small-interfering-RNA*-Sequenzen für deren katalytischen Untereinheiten p110 β und p110 γ gesucht und eine geeignete Transfektionsmethode (Lipofektion mit SAINT-RED) etabliert werden. Unter optimierten Bedingungen konnte die zelluläre Proteinmenge von p110 β um ca. 70 % und die von p110 γ um ca. 90 % reduziert werden.

In der vorliegenden Arbeit wird zum ersten Mal gezeigt, daß eine Stimulation von humanen Endothelzellen mit S1P zur Phosphorylierung der Isoform Akt1 führt und daß PI3K β , nicht aber PI3K γ die Akt1-Aktivierung vermittelt. Für die Initiierung dieses

Signalweges sind G_i-Proteine verantwortlich, während eine Transaktivierung von Rezeptortyrosinkinasen durch S1P keine Rolle spielt. S1P induziert auch die Phosphorylierung der eNOS, dies erfolgt aber nur partiell über den PI3K β /Akt1-Signalweg. Zudem ist S1P nur ein schwacher Stimulus für die Aktivierung der eNOS, da es nur eine geringe Erhöhung von cGMP, einem Indikator für NO, bewirkt.

Unsere Daten zeigen weiterhin, daß S1P die kleine GTPase Rac1 aktiviert und daß dieser Prozeß partiell sowohl durch PI3K β als auch durch PI3K γ vermittelt wird. Entgegen verschiedener Literaturbefunde konnten wir keine Interaktion zwischen Akt und Rac1 nachweisen und weder bestätigen, daß Akt Rac1 aktiviert, noch daß ein umgekehrter Signalweg existiert. Die Aktivierungen von Akt1 und Rac1 nach S1P werden zwar beide durch PI3Ks vermittelt, erfolgen aber unabhängig voneinander.

S1P führt auch zur G_i-Protein-abhängigen und Rezeptortyrosinkinase-unabhängigen Aktivierung von ERK1/2, die allerdings weder durch PI3K β noch durch PI3K γ vermittelt wird. Auch PI3K δ spielt keine Rolle. Da die ERK1/2-Phosphorylierung jedoch durch Wortmannin, einen generellen PI3K-Inhibitor partiell gehemmt wird, ist möglicherweise eine andere PI3K, zum Beispiel PI3K α , von Bedeutung.

Unsere Daten gewähren neue Einblicke in die Regulation S1P-induzierter Signalwege und ihre Bedeutung für die Migration von Endothelzellen. Die Migration von HUVEC wurde mit Hilfe eines Zwei-Kammer-Systems nach Boyden untersucht. Wir konnten nachweisen, daß sowohl PI3K β als auch PI3K γ an der Vermittlung der Migrationsantwort beteiligt sind und damit potentielle Zielmoleküle zur Beeinflussung der Migration darstellen. Da beide Isoformen für die Aktivierung von Rac1 essentiell sind, wird ihr Effekt auf die Migration vermutlich über Rac1 vermittelt. In Übereinstimmung damit zeigen unsere Daten, daß die Inhibition von Rac1 zu einer ausgeprägten Verminderung der S1P-induzierten Migration führt, wodurch die Bedeutung von Rac1 unterstrichen wird. Auch Akt1, ein spezifisches Effektormolekül von PI3K β , ist an der Vermittlung der Migration nach S1P-Stimulierung beteiligt. Das wurde in Experimenten gezeigt, in denen der Einsatz eines Akt1/2-Inhibitors zu einer deutlichen Verminderung der migratorischen S1P-Antwort führt. Dieser Effekt konnte auf Akt1 zurückgeführt werden, da Akt2 in Endothelzellen nicht exprimiert ist. Im Rahmen dieser Arbeit konnte weiterhin zum ersten Mal gezeigt werden, daß ERK1/2 eine wichtige Rolle bei der S1P-induzierten Migration von HUVEC haben.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit tragen zu einem besseren Verständnis der Signalwege in der S1P-induzierten Migration von humanen Endothelzellen bei und bieten daher neue Ansatzpunkte für therapeutische Strategien zur Beeinflussung verschiedener pathologischer Angiogeneseprozesse im Menschen. Insbesondere die Aufklärung der Funktion der PI3K-Isoformen wird durch den Einsatz Isoform-spezifischer Inhibitoren eine gezielte Beeinflussung bestimmter Signalwege ermöglichen.

Summary

Endothelial cells form the inner layer of blood vessels, which are responsible for supplying all tissues of higher organisms with blood. The development of new vessels from endothelial cells of already existing vessels is called angiogenesis. This process is required for growth and wound healing but is also involved in the pathogenesis of cancer and chronic inflammatory diseases. Therefore, the disclosure of angiogenic signaling pathways is of great medical interest and a precondition for the development of new therapies to treat pathological forms of angiogenesis.

The formation of new vessels by lateral sprouting of capillaries starts with the local activation of endothelial cells by different soluble agents, among them bioactive lipids like sphingosine 1-phosphate (S1P). Upon stimulation, endothelial cells disconnect from each other, activate proteases for the degradation of extracellular matrix, proliferate and migrate into the surrounding tissue where they finally form new capillaries.

Endothelial migration is an essential step of angiogenesis and an interesting target for biomedical research. The process of migration requires cyclic changes of the cells, which lead to detachment from the matrix, forward movement and re-adhesion and which are regulated by a complex signaling network. On the molecular level, migration depends on dynamic polarisation of signaling molecules and reorganization of the cytoskeleton upon stimulation with chemotactic stimuli.

The phospholipid S1P is a potent stimulus for the migration of endothelial cells, whose relevance for pathological angiogenetic processes had already been shown. S1P stimulates endothelial cells by binding to the G-protein coupled receptors S1P₁ and S1P₃ but the mechanisms of the S1P-induced migration have not been sufficiently clarified. According to literature, phosphoinositide 3-kinases (PI3Ks), Akt, endothelial NO synthase (eNOS), Rac and the extracellular signal-regulated kinases 1 and 2 (ERK1/2) are involved in regulation of S1P-induced migration. The contribution of the individual signaling pathways, the interaction between the signaling molecules and the function of individual signaling protein isoforms are, however, insufficiently characterized and were analyzed in the present study. Our work especially focuses on the role of the G_i-protein sensitive PI3K isoforms (PI3K β and PI3K γ) as mediators of signals initiated by S1P via binding to its receptors S1P₁ and S1P₃.

The experiments were performed with cultures of human umbilical vein endothelial cells. To clarify the role of individual signaling proteins, specific inhibitors were used (TGX-221 for PI3K β , AS-252424 for PI3K γ , NSC-23766 for Rac1, Akt1/2-Inhibitor for Akt and L-NAME for eNOS). In addition, RNA interference technology was applied to downregulate the expression of PI3K β and PI3K γ . Therefore, small interfering RNA sequences targeting the catalytic subunits of PI3Ks, p110 β and p110 γ , had to be selected and an appropriate transfection method (lipofection with SAINT-RED) had to be established. Under optimized conditions the cellular amounts of p110 β and p110 γ protein could be reduced by approx. 70% and 90%, respectively.

The present work shows for the first time, that a stimulation of human endothelial cells with S1P leads to the phosphorylation of the Akt1 isoform and that PI3K β but not PI3K γ mediates Akt1 activation. G_i proteins are responsible for the initiation of this signaling pathway whereas the transactivation of receptor tyrosine kinases by S1P does not play a role. S1P also induces the phosphorylation of eNOS, but this is only partially mediated via the PI3K β /Akt1 signaling pathway. Moreover, S1P is only a weak stimulus for eNOS activation because it causes only a minor increase of the cellular NO indicator cGMP.

Furthermore, our data show that S1P activates the small GTPase Rac1 and that this process is partially mediated by both, PI3K β and PI3K γ . In contrast to published studies, we could not detect an interaction between Akt and Rac1 and neither confirm that Akt activates Rac1 nor that Rac1 acts upstream from Akt. Thus, although the activation of Akt1 and Rac1 initiated by S1P are both mediated by PI3Ks, they occur independent of each other.

S1P also leads to the G_i protein-dependent and receptor tyrosine kinase-independent activation of ERK1/2, which is, however, neither mediated by PI3K β nor PI3K γ . Similarly, specific inhibition of PI3K δ did not affect S1P-induced ERK1/2 activation. In contrast, wortmannin, a general PI3K inhibitor, partially inhibits ERK1/2 phosphorylation triggered by S1P suggesting that another PI3K, for example PI3K α , is involved.

Finally, our data provide new insights in the regulation of S1P-induced migration of endothelial cells via different signaling pathways. The migration of HUVEC was investigated using a modified Boyden chamber assay. We demonstrate that both PI3K β and PI3K γ are involved in the mediation of the migratory response towards S1P and thus are potential target molecules to influence migration pharmacologically. Because both isoforms are essential for Rac1 activation, their effect on migration is most likely mediated by Rac1. Accordingly, inhibition of Rac1 leads to a pronounced reduction of the S1P-induced migration emphasizing the importance of Rac1. Akt1, a specific effector molecule of PI3K β , is involved in the migration after S1P stimulation as well. This is shown in experiments, where the application of an Akt1/2-inhibitor led to a considerable attenuation of the migratory S1P response. The effect could be ascribed to Akt1, because Akt2 is not expressed in endothelial cells. Furthermore, we show for the first time, that ERK1/2 play an important role in mediating the S1P induced migration of HUVEC.

The results of the present work add to a better understanding of the signaling pathways in S1P- induced migration of human endothelial cells and may contribute to new therapeutic strategies to affect pathological angiogenic processes in humans. In particular, the identification of distinct functions of PI3K isoforms will allow a targeted manipulation of signaling pathways using isoform specific inhibitors.

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
1.1	Angiogenese	1
1.2	Migration von Endothelzellen	2
1.3	Sphingosin-1-Phosphat.....	4
1.4	Intrazelluläre Mediatoren von S1P.....	5
1.4.1	Phosphoinositid-3-Kinasen der Klasse I.....	5
1.4.2	Serin/Threonin-Kinase Akt	8
1.4.3	Endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase	10
1.4.4	Extrazellulärsignal-regulierte Kinasen 1 und 2	11
1.4.5	Rho-GTPase Rac1	12
1.5	Fragestellung	14
2	MATERIAL UND METHODEN	15
2.1	Material	15
2.1.1	Zelltypen	15
2.1.2	DNA-Oligonukleotide	15
2.1.3	siRNA-Duplexe	15
2.1.4	Antikörper	16
2.1.5	Inhibitoren und Stimulanzen	17
2.1.6	Zellkultur- und Transfektionsreagenzien	18
2.1.7	Reagenzien für RNA-Analytik.....	19
2.1.8	Reagenzien für Zell-Lyse und Proteinanalytik.....	19
2.1.9	Reagenzien für die cGMP-Bestimmung	20
2.1.10	Reagenzien für Migrationsassays	20
2.1.11	Weitere Reagenzien und Materialien	21
2.2	Methoden	21
2.2.1	Zellkultur	21
2.2.1.1	Kultivierung von HEK293::p110 γ -Zellen	21
2.2.1.2	Präparation und Zellkultur von HUVEC	21
2.2.2	RNA-Interferenz durch Transfektion mit siRNA.....	22
2.2.2.1	Calciumphosphatmethode.....	23
2.2.2.2	Elektroporation mittels Nucleofector™ I	25
2.2.2.3	Transfektion mittels SAINT-RED	25
2.2.3	RNA-Analytik	26
2.2.3.1	RNA-Isolation	26
2.2.3.2	Reverse Transkription und PCR (<i>polymerase chain reaction</i>)	26
2.2.3.3	Agarose-Gelelektrophorese	26
2.2.4	Inhibition von Signalwegen.....	27
2.2.5	Stimulationsexperimente	28

2.2.6	Proteinanalytische Methoden	29
2.2.6.1	Proteinkonzentrationsbestimmung	29
2.2.6.2	Immunpräzipitation der PI3K β	29
2.2.6.3	Rac-Aktivitäts-Assay	30
2.2.6.4	SDS-PAGE (<i>Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>)	31
2.2.6.5	Elektro-Blot	31
2.2.6.6	Immundetektion im Western Blot	31
2.2.7	cGMP-Bestimmung	32
2.2.8	Migrationsassay	32
2.2.9	Bestimmung der Signalintensitäten und Statistische Analyse	33
3	ERGEBNISSE	34
3.1	Etablierung der RNA-Interferenz-Methode	34
3.1.1	p110 γ -siRNA-Screening	34
3.1.2	Optimierung der siRNA-Transfektion in HUVEC	35
3.1.3	p110 β -siRNA	37
3.2	S1P-induzierte Phosphorylierung von Akt in HUVEC.....	40
3.2.1	Zeitlicher Verlauf	40
3.2.2	Wirkung von Tyrosinkinase-Inhibitoren	41
3.2.3	Wirkung verschiedener PI3K-Inhibitoren	41
3.2.4	Wirkung des Knockdown von p110 γ und p110 β	45
3.2.5	RT-PCR zum Nachweis von p101 und p87	46
3.3	S1P-induzierte Phosphorylierung von eNOS	46
3.3.1	Zeitlicher Verlauf	46
3.3.2	Wirkung von TGX-221	47
3.3.3	Wirkung des Calcium-Chelators BAPTA-AM.....	49
3.3.4	cGMP-Messungen.....	50
3.4	S1P-induzierte Phosphorylierung von ERK1/2.....	51
3.4.1	Zeitlicher Verlauf	51
3.4.2	Wirkung von Tyrosinkinase-Inhibitoren	51
3.4.3	Wirkung verschiedener PI3K-Inhibitoren	51
3.4.4	Wirkung des Calcium-Chelators BAPTA-AM.....	54
3.5	S1P-induzierte Aktivierung von Rac1	55
3.5.1	Zeitlicher Verlauf und Wirkung verschiedener PI3K-Inhibitoren	55
3.5.2	Untersuchung von Rac-Akt-Interaktionen.....	55
3.6	S1P-induzierte Migration von Endothelzellen	58
3.6.1	Wirkung verschiedener PI3K-Inhibitoren	58
3.6.2	Wirkung von Akt-, eNOS-, Rac1- und MEK-Inhibitoren	59

4	DISKUSSION.....	61
4.1	RNA-Interferenz-Methode.....	61
4.2	S1P-induzierte Akt-Phosphorylierung in HUVEC.....	64
4.3	S1P-induzierte eNOS-Phosphorylierung in HUVEC.....	66
4.4	S1P-induzierte ERK1/2-Phosphorylierung.....	68
4.5	S1P-induzierte Rac1-Aktivierung.....	70
4.6	S1P-induzierte Migration von Endothelzellen	71
5	LITERATUR.....	75
6	ANHANG	92
6.1	Abkürzungen.....	92
6.2	Veröffentlichung der Ergebnisse dieser Arbeit.....	95
6.3	Danksagung	96
6.4	Ehrenwörtliche Erklärung	97
6.5	Lebenslauf.....	98

1 Einleitung

1.1 Angiogenese

Unter Angiogenese versteht man die Weiterentwicklung des primären Gefäßnetzwerkes durch Wachstums- und Remodellierungsprozesse und die Bildung neuer Gefäße aus bereits vorhandenen. Die Entstehung von Gefäßen im Verlauf der Embryonalentwicklung durch Differenzierung von peripheren Hämangioblasten zu Angioblasten und weiterhin zu Endothelzellen wird dagegen als Vaskulogenese bezeichnet (Carmeliet 2000; Lamalice *et al.* 2007). Die Angiogenese stellt den wesentlichen Mechanismus der Vaskularisierung bei physiologischen Prozessen wie Organogenese oder Wachstum dar. Auch beim Menstruationszyklus und der Schwangerschaft spielen Angiogeneseprozesse eine wichtige Rolle. Darüber hinaus ist Angiogenese an pathologischen Prozessen beteiligt und ist sowohl an der Ausprägung bestimmter Erkrankungen wie Psoriasis, rheumatoider Arthritis, diabetischer Retinopathie und Tumoren als auch an Regenerationsprozessen nach Infarkten sowie Wundheilung beteiligt. Die Untersuchung der Mechanismen der Angiogenese ist daher ein wichtiger medizinischer Forschungsschwerpunkt. Ein besseres Verständnis dieser Prozesse kann zur Entwicklung neuer Therapieansätze für die Behandlung von Gefäß- und Tumorerkrankungen beitragen, die weltweit zu den führenden Todesursachen zählen. Von der erfolgreichen Erforschung der subzellulären molekularen Mechanismen der Gefäßbildung ist es beispielsweise abhängig, ob es möglich sein wird, die ischämische Herzkrankheit durch Stimulation der myokardialen Angiogenese zu behandeln oder Tumorerkrankungen durch Unterdrückung exzessiven Gefäßwachstums zu heilen (Carmeliet 2000; Mathers & Loncar 2006).

Die Bildung neuer Gefäße kann durch seitliche Aussprossung neuer Kapillaren oder über die Längsteilung bestehender Kapillaren durch Reorganisierung der vorhandenen Zellen erfolgen. Die meisten Arbeiten haben sich bisher mit dem Prozeß der Aussprossung befaßt (Carmeliet 2000; Muñoz-Chápuli *et al.* 2004). Dieser Prozeß wird durch Angiogenesefaktoren gesteuert. Diese werden beispielsweise von Gewebe freigesetzt, das nicht ausreichend mit Sauerstoff versorgt wird. Ebenso können Immunzellen Angiogenesefaktoren freisetzen und somit bei örtlichen Reizungen und Infektionen die Bildung neuer Kapillaren verursachen, von denen sich aber die meisten wieder zurückbilden, wenn die Entzündung abklingt. Auch wachsende Tumore stimulieren die Angiogenese, um ihre Blutversorgung zu sichern. Ohne die Bildung eines Kapillarnetzes kann ein Tumor nur einen Durchmesser von wenigen Millimetern erreichen. Zu den Angiogenesefaktoren gehören sowohl Proteine wie *vascular endothelial growth factor* (VEGF) und *basic fibroblast growth factor* (bFGF) als auch Lipide wie Prostaglandin E2 und S1P. Für den kontrollierten Ablauf der Gefäßbildung spielen außerdem natürliche Angiogeneseinhibitoren wie das Protein Angiostatin eine wichtige Rolle (Alberts *et al.* 1995; Jackson *et al.* 1997; English *et al.* 2000).

Gefäße, die mit Angiogenesefaktoren in Kontakt kommen, erweitern sich zunächst und erhöhen ihre Permeabilität. Dadurch kommt es zum Austritt von Plasmaproteinen, die ein provisorisches Gerüst für migrierende Endothelzellen bilden. Im Bereich der Aussprossung werden dann die Zell-Zell- und Zell-Matrix-Kontakte gelockert, um den Endothelzellen die Migration zu ermöglichen. Zusätzlich werden von den Endothelzellen verschiedene membrangebundene Metalloproteinasen aktiviert, die zur Degradation der angrenzenden extrazellulären Matrix führen. Danach können sich die Endothelzellen durch Proliferation und Migration im umliegenden Gewebe ausbreiten und zu kettenartigen Strukturen assemblieren. Das Gefäßlumen entsteht über die Bildung langgestreckter Vakuolen in den Endothelzellen, die schließlich miteinander fusionieren

und so einen Kapillarkanal bilden. Dieser Prozeß setzt sich fort, bis der Sproß eine andere Kapillare trifft und sich mit ihr verbindet, so daß Blut zirkulieren kann. Anschließend assoziieren Perizyten mit der Kapillar-Außenseite, wodurch eine weitere Proliferation und Migration der Endothelzellen gehemmt und die Bildung der Basalmembran gefördert wird. Abhängig vom umliegenden Gewebe entstehen Gefäße mit kontinuierlichem (Blut-Hirn-Schranke), fenestriertem (endokrine Drüsen) oder diskontinuierlichem Endothel (Leber). Hämodynamische Kräfte, die Versorgung des Endothels mit Nährstoffen und anti-apoptotische Signalmoleküle sorgen dafür, daß die neuen Gefäße erhalten bleiben. Unter bestimmten Bedingungen wie erhöhtem Durchflußvolumen können sich die Gefäße auch im Durchmesser vergrößern und in Abhängigkeit vom Blutdruck zu Arterien und Venen weiter entwickeln. Dabei werden unter dem Einfluß von Signalen aus den Endothelzellen Bindegewebe und glatte Muskulatur an das neue Gefäß angelagert und je nach Durchmesser und Funktion des Blutgefäßes unterschiedlich dicke Gefäßwände ausgebildet (Alberts *et al.* 1995; Carmeliet 2000).

1.2 Migration von Endothelzellen

Die gerichtete Migration von Zellen unterschiedlichen Typs ist für Wundheilungs- und Regenerationsprozesse und die Funktion des Immunsystems von Bedeutung (Affolter & Weijer 2005) und spielt bei pathologischen Prozessen wie Wachstum und Metastasierung von Tumoren eine wichtige Rolle (Gaßmann *et al.* 2004). Die Migration von Endothelzellen ist eine essentielle Komponente der Angiogenese (Lamallice *et al.* 2007) und letztlich für die Positionierung der neuen Gefäße verantwortlich. Das Verständnis der Mechanismen, die die endotheliale Migration kontrollieren, ist daher von besonderer biomedizinischer Bedeutung.

Generell wird die Migration von Endothelzellen durch lösliche Lockstoffe (Chemotaxis), immobilisierte Proteine der extrazellulären Matrix (Haptotaxis) und mechanische Stimuli (Mechanotaxis) bestimmt. So steuern die geänderten Strömungsverhältnisse und Scherkräfte nach einer Verwundung die wandernden Endothelzellen entlang der interstitiellen Tunnel in Flußrichtung. Während der Angiogenese spielen sich primär chemotaktische Prozesse ab, die durch verschiedene Angiogenesefaktoren ausgelöst werden. Zu den Chemotaxis-auslösenden Substanzen zählen VEGF, bFGF, Angiopoetin-1 und weitere Proteine aus fast allen Zytokin-Familien sowie verschiedene Lipid-Mediatoren. Chemotaktisch wirksame Substanzen werden unter anderem bei Sauerstoffmangel vom betroffenen Gewebe und auch von Endothelzellen selbst sezerniert. Die bekanntesten Lipid-Mediatoren sind Prostaglandin E₂, das beispielsweise von Immunzellen und Tumorgewebe sezerniert werden kann, und S1P, das unter anderem von Thrombozyten während der zellulären Hämostase freigesetzt wird (English *et al.* 2000; Muñoz-Chápuli *et al.* 2004; Grkovich *et al.* 2006; Lamallice *et al.* 2007).

Endothelzellen wie auch andere migrationsfähige Zellen reagieren auf Gradienten chemotaktischer Stoffe mit einer dynamischen Polarisierung in Richtung des Gradienten. Dafür ist eine asymmetrische Verteilung von Signalmolekülen, Zell-Adhäsionsmolekülen und Zytoskelett-Bestandteilen ebenso nötig, wie ein gerichteter Transport von Vesikeln zur Membran. Die polarisierte Zellform ist charakterisiert durch „*membrane ruffling*“ und Filopodien am Vorderende, Reorientierung des Zentrosoms und des Golgi-Apparates in Migrationsrichtung und Stabilisierung spezifischer Mikrotubuli-Enden im Bereich des Leitsaums (Fukata *et al.* 2003). Die Polarisierung ermöglicht die kontinuierliche Detektion des chemotaktischen Gradienten mittels der Filopodien. Sie ist außerdem nötig für die Bildung und den Vorschub von Lamellipodien und pseudopodienähnlichen Membranvorstülpungen in Gradientenrichtung und deren anschließender Befestigung an

der extrazellulären Matrix über fokale Adhäsionskontakte. Auch die Lockerung der Adhäsionskontakte im hinteren Zellbereich und das Nachziehen dieses Bereichs durch Kontraktion von Streßfasern (Aktomyosinfilamenten) wird durch die Polarisierung der Zelle möglich (Lamalice *et al.* 2007). Migrierende Endothelzellen zeigen eine dendritische Morphologie, charakterisiert durch einen runden spindelförmigen Zellkörper, von dem in Migrationsrichtung dicke zylindrische Pseudopodien ausgehen, die sich verzweigen und winzige Lamellipodien und Filopodien an ihren Enden aufweisen (Martins & Kolega 2006).

Die treibende Kraft zur Migration entsteht durch die Kopplung von Aktinfilamentverlängerung im Bereich der Zellfront und Kontraktion der Aktomyosinfilamente im hinteren Bereich der Zelle (Jaffe & Hall 2005). Während der Migration findet daher eine ständige lokale Reorganisation des Aktinzytoskeletts statt. Die Aktinpolymerisierung wird durch Aktin-bindende Proteine reguliert, die diesen Prozeß fördern (Cortactin, WASP, Arp2/3, Girdin), kortikales Aktin stabilisieren (Filamin, VASP) oder Aktindepolymerisierung induzieren (Cofilin, Gelsolin). Für die Bildung von Aktomyosinfilamenten ist die Phosphorylierung der regulatorischen leichten Kette des Myosin II essentiell. Dies wird sowohl durch die calciumabhängige Myosin-leichte-Kette-Kinase als auch durch eine Hemmung der Myosin-leichte-Kette-Phosphatase vermittelt (Enomoto *et al.* 2006; Le Clairche & Carlier 2008).

Aktinpolymerisierung und Aktin-Myosin-Interaktionen werden durch kleine GTPasen der Rho-Familie (Rac1, Cdc42, RhoA) kontrolliert. Rac1 vermittelt die kortikale Aktinbildung und „*membrane ruffling*“ unter anderem durch Translokation von Cortactin und Aktivierung der p21-aktivierten Kinase (PAK), Cdc42 reguliert die Bildung von Filopodien und RhoA ist für die Assemblierung der Aktomyosinfilamente und die Reifung der fokalen Adhäsionskontakte verantwortlich. Ein wichtiges Effektormolekül von RhoA ist die Rho-Kinase (ROCK), welche für die Hemmung der Myosin-leichte-Kette-Phosphatase verantwortlich ist und dadurch die Phosphorylierung der leichten Kette des Myosins fördert. ROCK führt außerdem zur Stabilisierung der Aktinfilamente durch Inhibition von Cofilin über LIMK und zum Abbau fokaler Adhäsionen im hinteren Bereich der migrierenden Zelle durch Phosphorylierung der fokalen Adhäsionskinase (FAK) (Jaffe & Hall 2005; Lamalice *et al.* 2007). Der Abbau von Adhäsionskontakten wird des weiteren durch ERK-abhängige FAK-Phosphorylierung und Aktivierung der Protease Calpain gefördert (Huang *et al.* 2004). Die Bildung fokaler Adhäsionspunkte wird dagegen durch die NO-vermittelte Formierung funktioneller Integrinkomplexe unterstützt (Murohara *et al.* 1999; Watanabe *et al.* 2005).

Obwohl die Kenntnisse über die Regulation der endothelialen Migration bereits sehr umfangreich sind, sind viele Details zu den zugrunde liegenden Signalwegen noch unklar. Insbesondere muß geklärt werden, inwieweit bestimmte chemotaktische Stimuli spezifische Signalwege aktivieren. In diesem Zusammenhang sind Signalwege, die durch Lipidmediatoren wie S1P initiiert werden, von besonderem Interesse, da neuere Arbeiten in S1P-Rezeptor-Knockout-Mäusen zeigen, daß S1P für die Motilität der Endothelzellen und die Regulation der Angiogenese essentiell ist (Tani *et al.* 2007). Auch die Relevanz von S1P bei der tumorinduzierten Angiogenese wurde in verschiedenen Arbeiten gezeigt.

1.3 Sphingosin-1-Phosphat

S1P ist ein bioaktives Lipid, das bei der Regulation zellulärer Prozesse wie Proliferation, Migration und Differenzierung von Endothelzellen und anderen Zellen eine wichtige Rolle spielt (Chae *et al.* 2004; Visentin *et al.* 2006). S1P findet man in nanomolaren Konzentrationen im humanen Blutplasma (191 ± 79 nM) (Tani *et al.* 2007). Der Großteil davon ist an Lipoproteine und Albumin gebunden. S1P ist essentiell für die vaskuläre Integrität und hat zellschützende und möglicherweise auch antiatherogene Eigenschaften (Hait *et al.* 2006; Rosen *et al.* 2007).

S1P kann extrazellulär gebildet oder von verschiedenen Zellen sezerniert werden. Thrombozyten werden als Hauptquelle für das mit dem Blut zirkulierende S1P angesehen. Sie nehmen Sphingosin auf, ein Abbauprodukt von Sphingomyelin, und phosphorylieren es mittels verschiedener Sphingosinkinasen zu S1P. Der Mechanismus der S1P-Freisetzung ist noch nicht geklärt, vermutlich sind aber Adenosintriphosphat-abhängige Transportproteine von Bedeutung (Tani *et al.* 2007). Die Freisetzung von S1P aus Thrombozyten während der Wundheilung spielt wahrscheinlich eine wichtige Rolle bei der Neovaskularisierung (English *et al.* 2002). Endothelzellen sezernieren nach Stimulation mit verschiedenen Wachstumsfaktoren wie VEGF und PDGF ebenfalls S1P, schütten aber deutlich weniger aus als Blutzellen. Möglicherweise verstärkt das freigesetzte S1P über autokrine und parakrine Mechanismen die Wachstumsfaktor-induzierte Migration von Endothelzellen und die Gefäßreifung. Endothelzellen können auch Sphingosinkinase 1 in den extrazellulären Raum freisetzen, die dort dann Sphingosin zu S1P phosphoryliert. Der Abbau von S1P erfolgt über zwei unterschiedliche Wege. Der erste ist die reversible Dephosphorylierung zu Sphingosin durch S1P-Phosphatasen. Der zweite ist der irreversible Abbau zu Hexadecenal und Phosphoethanolamin durch eine Pyridoxalphosphat-abhängige S1P-Lyase (Spiegel & Milstien 2003).

S1P wirkt als extrazellulärer Ligand für G-Protein-gekoppelte Rezeptoren vor allem an Blutzellen, Endothelzellen und glatten Muskelzellen und spielt eine Rolle in der Koordination der Migration dieser Zellen. Die Bindung von S1P an die entsprechenden Rezeptoren führt zur Stimulierung zahlreicher Signalwege wie zum Beispiel des Phospholipase C/Inositoltrisphosphat/ Ca^{2+} -Signalweges, der ERK1/2-MAPK-Kaskade, und des Phosphoinositid-3-Kinase/Akt/NO-Synthase-Weges sowie zur Hemmung der Adenylatzyklase (Kluk & Hla 2002). Daneben wird diskutiert, ob S1P auch als intrazelluläres Signalmolekül wirken kann (Tani *et al.* 2007). So führt die Freisetzung von S1P im Zytosol zum Ausstrom von Calcium aus dem endoplasmatischen Retikulum (Meyer zu Heringdorf *et al.* 2003). Des weiteren vermittelt zytosolisches S1P die VEGF-induzierte Aktivierung von Ras und ERK, die Tumornekrosefaktor- α -stimulierte Aktivierung von NF- κ B und die PECAM-1-abhängige Aktivierung von Akt. Es spielt auf diese Weise eine wichtige Rolle beim Schutz vor Apoptose und bei der Proliferation (Chalfant & Spiegel 2005).

Der erste S1P-Rezeptor wurde in HUVEC, die zur Differenzierung angeregt worden waren, als induzierbarer G-Protein-gekoppelter Rezeptor nachgewiesen. Da der zugehörige Ligand noch nicht bekannt war, nannte man das Gen „*endothelial differentiation gene 1*“ (EDG-1) (Hla & Maciag 1990). Inzwischen sind acht Mitglieder der EDG-Familie bekannt, die alle mit bioaktiven Lipiden interagieren. Sie unterscheiden sich unter anderem in ihrer Affinität zu S1P und Lysophosphatidsäure. EDG-Rezeptoren, die S1P mit höherer Affinität binden, werden inzwischen als S1P-Rezeptoren 1-5 (S1P₁-S1P₅) bezeichnet: S1P₁ (EDG-1), S1P₂ (EDG-5), S1P₃ (EDG-3), S1P₄ (EDG-6) und S1P₅ (EDG-8). Während S1P₄ hauptsächlich in Zellen des hämatopoetischen Systems zu finden ist und S1P₅ überwiegend im Gehirn vorkommt, werden S1P₁, S1P₂ und S1P₃ in

vielen Geweben und Zelltypen exprimiert (Kluk & Hla 2002). Endothelzellen exprimieren S1P₁, S1P₂ und S1P₃, wobei das Expressionsmuster von Spezies und Gefäßtyp abhängig ist (Kimura *et al.* 2000; Morales-Ruiz *et al.* 2001). In HUVEC werden nur die Rezeptoren S1P₁ und S1P₃ exprimiert (Lee *et al.* 1999; Lin *et al.* 2007). S1P₁ und S1P₃ bilden sowohl Homodimere als auch Heterodimere und -oligomere über Disulfidbrücken (Van Brocklyn *et al.* 2002).

Der Rezeptor S1P₁ aktiviert ausschließlich Pertussistoxin-sensitive Mitglieder der Familie der inhibitorischen heterotrimeren Guanosintriphosphat-(GTP)-bindenden Proteine (G_i), während der Rezeptor S1P₃ heterotrimere G-Proteine der Familien G_i, G_q und G₁₂ aktivieren kann (Windh *et al.* 1999). Beide Rezeptoren können eine Reihe von Signalprozessen gleichermaßen stimulieren, andererseits sind für S1P₁ und S1P₃ auch spezifische Funktionen beschrieben worden. Knockoutversuche haben gezeigt, daß S1P₁ im Gegensatz zu S1P₃ für die Reifung der Blutgefäße essentiell ist. S1P₁ stimuliert die Expression von Adhäsionsmolekülen wie VE-Cadherin, PECAM-1 (Krump-Konvalinkova *et al.* 2005) und ICAM-1 (Lin *et al.* 2007) und vermittelt die S1P-induzierte Aktivierung der kleinen GTPase Rac (siehe Kapitel 1.4.5) (Lee *et al.* 1999). Der Rezeptor S1P₃ aktiviert die kleine GTPase RhoA und reguliert die Organisation des Zytoskeletts (Kluk & Hla 2002). Beide Rezeptoren vermitteln die Induktion der Expression von Entzündungsmediatoren wie Interleukin-8 und MCP-1 (Lin *et al.* 2007), führen zur Aktivierung der Phospholipase C (PLC) und nachfolgender intrazellulärer Calciumerhöhung und initiieren über G_i-Proteine die ERK1/2-MAPK-Kaskade (siehe Kapitel 1.4.4) (Takuwa 2002; Miura *et al.* 2003; Wu *et al.* 2005). Die nach Stimulation von S1P₁ oder S1P₃ freigesetzten $\beta\gamma$ -Untereinheiten der heterotrimeren G-Proteine (G $\beta\gamma$) aktivieren PI3Ks der Klasse I (Maier *et al.* 1999) und initiieren den PI3K/Akt/eNOS-Signalweg. Verschiedene der nach Bindung von S1P an S1P₁ und/oder S1P₃ induzierten Signalwege (Rac, RhoA, ERK1/2, PI3K/Akt/eNOS) sind an der Regulation von Migration und Angiogenese beteiligt. Darüber hinaus kann S1P über S1P₁ oder S1P₃ zur Transaktivierung von VEGF-Rezeptoren in Endothelzellen führen und auch auf diese Weise Angiogeneseprozesse aktivieren (Endo *et al.* 2002; Tanimoto *et al.* 2002). Dennoch gibt es zahlreiche offene Fragen hinsichtlich des Beitrags der einzelnen durch S1P induzierten Signalwege an der Migration, der Interaktion der verschiedenen Signalmoleküle und der Isoform-spezifischen Charakterisierung der einzelnen Moleküle. Gegenwärtig eröffnen neue experimentelle Technologien und Isoform-spezifische Inhibitoren die Möglichkeit, diese Signalwege genauer zu untersuchen. Die wichtigsten bisher bekannten migrationsrelevanten Signalwege, die durch S1P in Endothelzellen ausgelöst werden, sind in Abbildung 1 zusammengefaßt.

1.4 Intrazelluläre Mediatoren von S1P

1.4.1 Phosphoinositid-3-Kinasen der Klasse I

Phosphoinositid-3-Kinasen katalysieren die Phosphorylierung der D3-Hydroxylgruppe des Inositolrings von Phosphatidylinositol (PtdIns) und seinen einfach oder doppelt phosphorylierten Derivaten (PtdIns4P oder PtdIns(4,5)P₂). PI3Ks werden auf Grundlage der Strukturunterschiede ihrer katalytischen Untereinheiten und der damit einhergehenden Unterschiede ihrer Substratspezifität *in vitro* in drei Klassen eingeteilt.

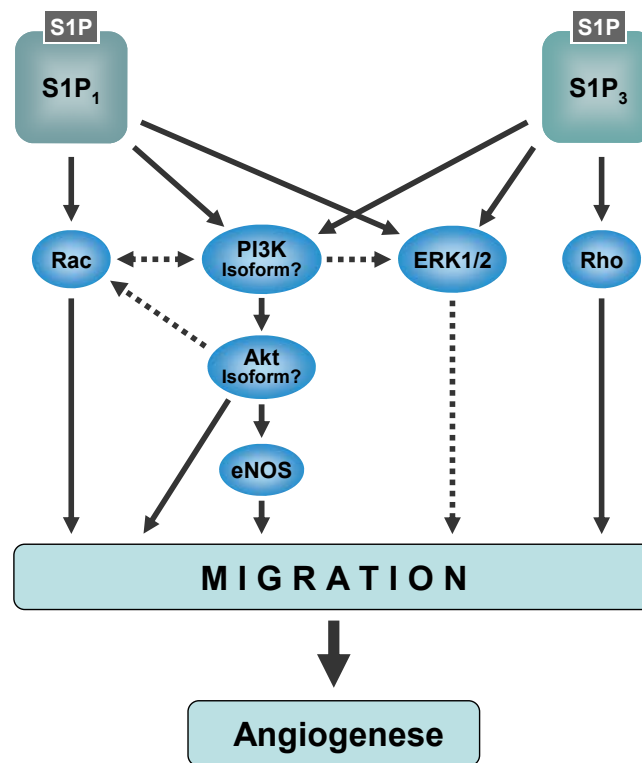


Abbildung 1: Signalwege in der S1P-induzierten Migration von Endothelzellen

Die Stimulation der S1P-Rezeptoren kann in Endothelzellen unter anderem zur Aktivierung von GTPasen (Rac, Rho), Kinasen (PI3Ks, Akt, ERK1/2) und der endothelialen NO-Synthase (eNOS) führen. Eine Rolle in der Regulation der Migration konnte für Rac, Rho, PI3Ks, Akt und eNOS in bestimmten Endothelzellen gezeigt werden. Die Bedeutung des PI3K/Akt/eNOS-Signalweges und die Funktion der einzelnen PI3K- und Akt-Isoformen wird aber noch kontrovers diskutiert. Eine migrationsfördernde Rolle für ERK1/2 konnte in Endothelzellen bisher nicht gefunden werden. Gestrichelte Pfeile kennzeichnen Signalwege mit unsicherer Datenlage.

Alle 3 Klassen weisen homologe Regionen in ihren katalytischen Untereinheiten auf: HR1 (katalytische Domäne), HR2 (Zusatzdomäne) und HR3 (C2-Domäne). PI3Ks der Klasse I (p110 α , β , γ und δ) und II besitzen zusätzlich eine Ras-Bindedomäne (HR4) und PI3Ks der Klasse II eine weitere C2-Domäne und eine Phox-Homologie-Domäne am C-Terminus. Klasse-III-PI3Ks können *in vitro* ausschließlich PtdIns phosphorylieren. Klasse I und II PI3Ks verwenden außerdem PtdIns4P und PtdIns(4,5)P₂ als Substrat, wobei PI3Ks der Klasse II eine wesentlich geringere Affinität als Klasse-I-PI3Ks zu diesen Phosphoinositiden haben (Fruman *et al.* 1998; Vanhaesebroeck *et al.* 2001; Wymann *et al.* 2003).

In allen bisher getesteten Säugerzelltypen findet sich mindestens ein Mitglied der Klasse-I-PI3Ks. Während PI3K α und β in den meisten Geweben einschließlich des Endothels exprimiert sind, findet man PI3K γ und δ vorwiegend in Leukozyten. Neuere Arbeiten beschreiben aber auch die Expression von PI3K γ und δ in Endothelzellen (Vanhaesebroeck *et al.* 1997; Go *et al.* 1998; Wymann & Pirola 1998; Puri *et al.* 2004; Puri *et al.* 2005; Singleton *et al.* 2005; Voigt *et al.* 2006).

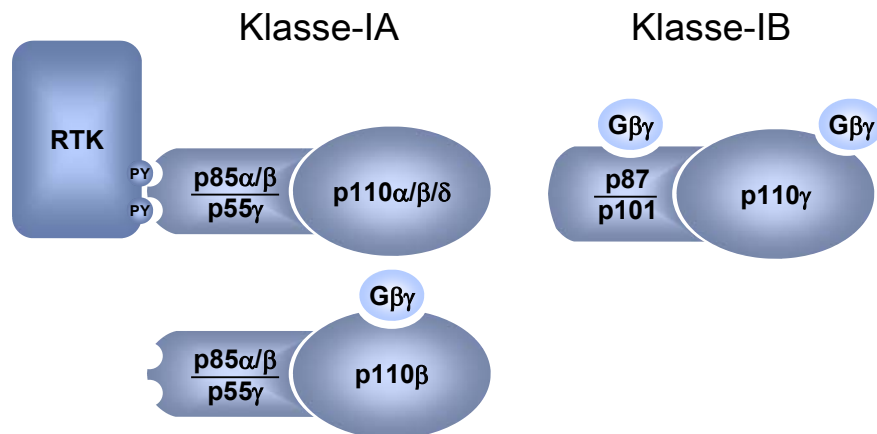


Abbildung 2: Übersicht der Klasse-I-PI3Ks

Die katalytischen Untereinheiten der Klasse-IA-PI3Ks (p110α, p110β, p110δ) dimerisieren jeweils mit einer regulatorischen p85-Untereinheit (p85α, p85β, p55γ). Über deren SH2-Domänen können sie an phosphorylierte Tyrosinreste (PY) binden und so beispielsweise durch Rezeptortyrosinkinasen (RTK) aktiviert werden. Klasse-IB-PI3Ks bestehen aus der katalytischen Untereinheit p110γ, die meist an eine der beiden regulatorischen Untereinheiten p101 oder p87^{PIKAP} gekoppelt ist. PI3Kβ und PI3Kγ können Gβγ-Untereinheiten heterotrimerer G-Proteine binden und so über G-Protein-gekoppelte Rezeptoren aktiviert werden.

Klasse-I-PI3Ks liegen überwiegend als Heterodimere aus katalytischer und regulatorischer Untereinheit vor. Sie werden in 2 Unterklassen (IA und IB) unterteilt (Abbildung 2). Die Heterodimere aus den katalytischen Untereinheiten p110α, p110β und p110δ und den regulatorischen Untereinheiten p85α, p85β, p55γ und deren Splicevarianten bilden die Unterklasse IA (PI3Kα, β und δ). Klasse-IA-PI3Ks können über die SH2-Domänen der regulatorischen Untereinheiten an phosphorylierte Tyrosinreste andocken und durch Rezeptortyrosinkinasen oder die Tyrosinkinase FAK, die nach Zelladhäsion autophosphoryliert wird, aktiviert werden. Die Unterklasse IB wird von p110γ mit ihren regulatorischen Untereinheiten p101 oder p87^{PIKAP} gebildet. p101 und p87^{PIKAP} haben jeweils eine Bindungsstelle für Gβγ und können so die Aktivierung der PI3Kγ durch G-Protein-gekoppelte Rezeptoren vermitteln (Chen *et al.* 1996; Stephens *et al.* 1997; Fruman *et al.* 1998; Vanhaesebroeck *et al.* 2001; Foster *et al.* 2003; Suire *et al.* 2005; Voigt *et al.* 2006). Die katalytischen Untereinheiten von PI3Kβ und γ können jedoch auch direkt durch Gβγ aktiviert werden (Stoyanov *et al.* 1995; Maier *et al.* 1999). p110α, p110γ und p110δ, jedoch nicht p110β, können auch durch die Bindung von GTP-Ras aktiviert werden (Rubio *et al.* 1997; Rubio *et al.* 1999; Vanhaesebroeck *et al.* 2001; Rodriguez-Viciana *et al.* 2004). Des weiteren können GTP-Rac1 und GTP-Cdc42 Klasse-IA-PI3Ks über die Bindung an deren regulatorische Untereinheit aktivieren (Zheng *et al.* 1994). Außerdem gibt es Hinweise darauf, daß Calmodulin Klasse-IA-PI3Ks (Joyal *et al.* 1997) und möglicherweise auch PI3Kγ durch direkte Bindung aktivieren kann (Fischer *et al.* 1998).

Klasse-I-PI3Ks können außer Phosphoinositiden auch Serinreste von Proteinen phosphorylieren. Beispiele dafür sind die Autophosphorylierung der PI3Ks oder die Phosphorylierung der regulatorischen Untereinheit, was meist zu einer Verringerung der Lipidkinaseaktivität führt (Fruman *et al.* 1998). Für PI3Kα wurden als weitere Proteinsubstrate bisher IRS-1, 4EBP-1 und H-Ras gefunden, während PI3Kγ 4EBP-1, H-Ras, Tropomyosin und MEK1 phosphorylieren kann (Bondeva *et al.* 1998; Pirola *et al.* 2001; Foukas & Shepherd 2004; Naga Prasad *et al.* 2005).

Die Hauptprodukte der Klasse-I-PI3Ks, PtdIns(3,4)P₂ und PtdIns(3,4,5)P₃ (PIP₃), sind Bindungspartner für Proteine mit passenden Pleckstrin-Homologie-Domänen (PH-Domänen). Durch die Bindung dieser Proteine an die entsprechenden Phosphoinositide erfolgt eine Translokation zur Plasmamembran in die Nähe von Substraten oder Reaktionspartnern und bei einigen Proteinen auch die Aufhebung einer intramolekularen Inhibition ihrer Funktion. Zu den Proteinen mit Phosphoinositid-bindenden PH-Domänen gehören verschiedene Kinasen, wie PDK-1 und Akt, Guaninnukleotid-Austauschfaktoren (GEFs), GTPase-aktivierenden Proteinen (GAPs) und Adapterproteine, die eine komplexe Palette von Signalwegen auslösen können. Der PI3K/Akt-Signalweg spielt dabei eine zentrale Rolle. Klasse-I-PI3Ks können auf diese Weise eine Vielzahl zellulärer Antworten wie Migration, Zellwachstum, Proliferation und Apoptose beeinflussen sowie zellspezifische Prozesse wie die Glukoseaufnahme von Adipozyten, die Histaminsekretion von Mastzellen und die NAD(P)H-Oxidase-Aktivierung in Neutrophilen kontrollieren (Hawkins *et al.* 2006).

Gegenspieler der PI3Ks sind die Phosphatasen PTEN, SHIP1 und SHIP2 (SHIPs), die PIP₃ und PtdIns(3,4)P₂ dephosphorylieren. Die Protein- und Lipidphosphatase PTEN dephosphoryliert vorrangig die D3-Position des Inositolrings von PIP₃ und in geringerem Maße auch PtdIns(3,4)P₂ und PtdIns3P (Maehama & Dixon 1998). PTEN ist konstitutiv aktiv und sorgt so dafür, daß die PIP₃-Konzentration in unstimulierten Zellen unter einem Schwellenwert bleibt. Die PTEN-Inaktivierung kann durch reversible Oxidierung der reaktiven Cysteinreste oder durch Phosphorylierung C-terminaler Serin- und Threoninreste erfolgen (Downes *et al.* 2007). SHIPs dephosphorylieren die D5-Position des Inositolrings von PIP₃ (Vanhaesebroeck *et al.* 2001). Sie zeigen in ruhenden Zellen nur eine geringe Aktivität und werden nach Stimulation mit verschiedenen Wachstumsfaktoren zur Zellmembran transloziert und aktiviert (Downes *et al.* 2007).

Chemotaktische Stimuli führen zur Aktivierung von PI3Ks und zur Generierung eines PIP₃-Gradienten entlang der Zelle. Dies ist ein wichtiger Mechanismus zum Aufbau und Erhalt der polarisierten Zellform, welche wiederum eine Voraussetzung für die Migration der Zelle ist. Erhöhte Konzentrationen von PIP₃ an der Zellfront führen zu einer erhöhten lokalen Aktivierung von Akt und Rac1 und einer verstärkten lokalen Aktinpolymerisierung (Watanabe *et al.* 2005; Primo *et al.* 2007). Die Entstehung des PIP₃-Gradienten wird vermutlich durch positive Rückkopplungsschleifen, zum Beispiel über eine GTP-Rac-vermittelte PI3K-Aktivierung, verstärkt (Zheng *et al.* 1994). Um die Migration von Zellen spezifisch beeinflussen zu können, sind Kenntnisse über die an der Entstehung des PIP₃-Gradienten beteiligten PI3K-Isoformen essentiell. Untersuchungen in Leukozyten zeigen beispielsweise, daß chemotaktische Stimuli vor allem die PI3K γ -Isoform aktivieren. Aus Endothelzellen liegen bisher keine Daten zur Charakterisierung der an der Migration beteiligten PI3K-Isoformen vor. Genausowenig ist bekannt, welche PI3K-Isoformen die Aktivierung von Akt und Rac1 nach S1P-Stimulierung der Zellen vermitteln.

1.4.2 Serin/Threonin-Kinase Akt

Die Proteinkinase Akt oder Proteinkinase B (PKB) ist ein wichtiges Effektormolekül von PI3Ks. Im humanen Genom wurden die drei homologen Gene Akt1, Akt2 und Akt3 (PKB α , - β und - γ) gefunden (Staal 1987; Andjelkovic *et al.* 1996; Brodbeck *et al.* 1999; Nakatani *et al.* 1999). Viele Arbeiten über die Akt-Familie enthalten keine Angaben über die untersuchte Isoform. Literaturzitate mit der Bezeichnung „Akt“ in diesem Text stammen aus solchen Quellen.

Akt1 und Akt2 sind in fast allen Geweben exprimiert, während Akt3 hauptsächlich in Hoden- und Nervengewebe zu finden ist (Heron-Milhavet *et al.* 2006). Endothelzellen exprimieren Akt1 und Akt3 (Fieber *et al.* 2006). Knockout-Experimente haben gezeigt, daß Akt1 die wichtigste der drei Isoformen für Embryonalentwicklung und postnatales Überleben ist (Dummler *et al.* 2006).

Alle Akt-Isoformen haben eine aminoterminal PH-Domäne, eine zentrale Serin/Threonin-Kinase-Domäne und eine karboxyterminale regulatorische Domäne. Zur vollständigen Aktivierung von Akt ist die Phosphorylierung konservierter Threonin- und Serin-Reste in der katalytischen bzw. regulatorischen Domäne erforderlich (Kandel & Hay 1999). Akt1 (humane Sequenz) wird dabei an Thr308/Ser473 phosphoryliert, Akt 2 an Thr309/Ser474 und Akt 3 an Thr305/Ser472 (Brodbeck *et al.* 1999; Nakatani *et al.* 1999). Die entsprechenden phosphospezifischen Antikörper können zwischen den Isoformen nicht unterscheiden (Cicenas *et al.* 2005), so daß im allgemeinen auf die Phosphorylierung von Thr308 beziehungsweise Ser473 Bezug genommen wird.

Voraussetzung für die Phosphorylierung von Akt ist, daß das Protein durch Bindung seiner PH-Domäne an PIP_3 an die Plasmamembran rekrutiert wird (Scheid *et al.* 2002b; Nishio *et al.* 2007). Gleichzeitig erfolgt die Translokation der konstitutiv aktiven PDK-1 zur selben Zellmembranregion über Bindung an PIP_3 und die Phosphorylierung von Thr308 durch PDK-1 (Kandel & Hay 1999; Hawkins *et al.* 2006). Thr308 kann auch PI3K/PIP_3 -unabhängig durch CaM-KK oder durch Proteinkinase A (PKA) phosphoryliert werden (Filippa *et al.* 1999). Letzteres führt aber nur zur unvollständigen Aktivierung von Akt. Die Identität der für die Phosphorylierung von Ser473 verantwortlichen Kinase wird noch kontrovers diskutiert (Fayard *et al.* 2005; Hawkins *et al.* 2006; Martelli *et al.* 2006). PDK-1 scheint dabei keine Rolle zu spielen, da eine Ser473-Phosphorylierung auch in PDK1-knockout-Zellen beobachtet wurde (Williams *et al.* 2000). Eine Akt-Autophosphorylierung ist ebenso unwahrscheinlich (Alessi *et al.* 1997; Andjelkovic *et al.* 1997; Scheid *et al.* 2002a; Sarbassov *et al.* 2005). Sehr wahrscheinlich ist allerdings, daß mTORC2 für die Phosphorylierung von Ser473 *in vivo* verantwortlich ist (Hresko & Mueckler 2005; Sarbassov *et al.* 2005; Frias *et al.* 2006). Trotz der noch ungeklärten Details ist die Bedeutung der Lipidkinaseaktivität von PI3Ks , die Akkumulation von $\text{PtdIns}(3,4)\text{P}_2$ und PIP_3 auf der zytosolischen Seite der Plasmamembran und die daraus folgende Rekrutierung von Akt, PDK1 und der Ser473-Kinase für die Aktivierung von Akt allgemein akzeptiert, so daß von einem PI3K/Akt -Signalweg gesprochen wird. Die Deaktivierung von Akt erfolgt über Proteinphosphatasen. So ist PP2A für die Dephosphorylierung von Thr308 zuständig, während $\text{PHLPP}\alpha$ Ser473 dephosphoryliert (Bayascas & Alessi 2005). Abhängig vom Zelltyp fungieren sowohl PTEN als auch SHIPs indirekt als Gegenregulatoren für die Aktivität von Akt (Hsieh *et al.* 2004; Franca-Koh *et al.* 2007).

Die Proteinkinase Akt reguliert durch eine Vielzahl von Effektoren zahlreiche zelluläre Prozesse. Akt fördert beispielsweise die Aufnahme von Glukose durch Translokation von Glukosetransportproteinen zur Zellmembran und die Glykogensynthese durch Inhibition der Glykogensynthase-Kinase 3. Eine Reihe von Akt-Substraten sind Proteine, die in die Regulation der Apoptose einbezogen sind. Akt phosphoryliert und deaktiviert die apoptosefördernden Proteine Bad und Caspase-9, erhöht die Expression antiapoptotischer Proteine durch Aktivierung der Transkriptionsfaktoren CREB (Bcl-2) und NF- κB (TRAF1 und 2) und reduziert die Expression proapoptotischer Proteine (Bim) durch Hemmung von FOXO-Transkriptionsfaktoren. Weiterhin beeinflußt Akt durch die Regulation von Transkriptionsfaktoren (FOXO, NF- κB , c-Myc) das Gleichgewicht zwischen Zyklinen und dem Zyklinkinase-Inhibitor p27 und steigert so die Proliferation von Zellen. Über den TSC/mTOR-Signalweg und c-Myc stimuliert Akt außerdem

Proteintranslation und Zellwachstum (Kandel & Hay 1999; Pugazhenthil *et al.* 2000). Akt phosphoryliert auch Proteine, die für die Reorganisation des Zytoskeletts während der Migration verantwortlich sind (Girdin, ACAP1 und eNOS). Girdin fördert die Bildung von Lamellipodien und Streßfasern, ACAP1 reguliert das Integrinrecycling und eNOS die Bildung funktioneller Integrinkomplexe. Diese Prozesse wurden auch in Endothelzellen beschrieben. Dabei ist nicht klar, welchen Anteil Akt-vermittelte Signalwege an der Vermittlung der Migration nach Stimulation von Endothelzellen mit spezifischen Stimuli, zum Beispiel mit S1P, haben und welches Akt-Effektormolekül die potentiell stimulus-spezifischen Antworten vermittelt. Insbesondere ist unklar, inwieweit eNOS an der S1P-induzierten Migration beteiligt ist. Ein weiterer kontrovers diskutierter Aspekt in Endothelzellen ist auch die mögliche Rolle von Akt in der Rac1-Aktivierung (Lee *et al.* 2001; Gonzalez *et al.* 2006).

1.4.3 Endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase

Endothelzellen exprimieren eNOS, eine von 3 NOS-Isoformen in Säugetieren, die die Reaktion von Arginin mit Sauerstoff zu Citrullin, Stickstoffmonoxid (NO) und Wasser katalysieren (Gorren & Mayer 2007). Die anderen beiden Isoformen sind die neuronale NOS (nNOS) und die induzierbare NOS (iNOS), die nach Einfluß von Zytokinen oder Lipopolysacchariden in vielen Geweben exprimiert wird (Pollock *et al.* 1991; Dudzinski *et al.* 2006)

Alle NOS-Isoformen bestehen aus einer N-terminalen Oxygenase- und einer C-terminalen Reduktase-Domäne, die durch eine Ca^{2+} /Calmodulin-Bindedomäne verbunden sind. NO-Bildung setzt einen gut regulierten Elektronentransport von der Reduktasedomäne zur Oxygenasedomäne voraus. Der Elektronendonator NADPH und die für den Elektronentransfer benötigten Flavine FMN und FAD binden an die Reduktase-Domäne. Die Oxygenasedomäne hat Bindungsstellen für Häm (Katalysezentrum), ein Zink-Ion, den Kofaktor Tetrahydrobiopterin und das Substrat Arginin. NO-Synthasen sind nur im dimeren Zustand aktiv (Förstermann & Münzel 2006a; Gorren & Mayer 2007).

Die eNOS ist über Myristoyl- und Palmitoylreste in der Zellmembran verankert, wo sie vorwiegend in Caveolae lokalisiert ist. In ruhenden Zellen ist eNOS durch Bindung an Caveolin-1, S-Nitrosylierung der Zink-bindenden Cysteine und Phosphorylierung am Thr495 der CaM-Bindedomäne inaktiv (Dudzinski *et al.* 2006; Förstermann 2006b). Nach Einwirkung von Scherkräften, Wachstumsfaktoren oder Entzündungsmediatoren wird eNOS aktiviert. Dies erfolgt durch Bindung von CaM nach Erhöhung des intrazellulären Calciumspiegels und/oder nach Phosphorylierung von Ser1177 am C-terminalen Ende der Reduktase-Domäne. Daneben kann es auch zu einer Dephosphorylierung am Thr495 kommen (Mount *et al.* 2007). CaM-Bindung und Ser1177-Phosphorylierung erhöhen den Elektronenfluß vom NADPH zur Hämgruppe. Die Ser1177-Phosphorylierung scheint für die Aktivierung des Enzyms essentiell zu sein. Eine der dafür verantwortlichen Kinasen ist Akt (PI3K/Akt/eNOS-Signalweg). Je nach Stimulus kann die Ser1177 aber auch durch PKA, AMP-aktivierte Proteinkinase (AMPK) oder CaMKII erfolgen. Neben dem Serinrest 1177 sind auch noch andere Phosphorylierungsstellen der eNOS (Ser633, Ser615, Ser114) bekannt, deren Funktion aber noch wenig untersucht ist.

NO, das kleinste bekannte Signalmolekül, verfügt über ein ungepaartes Elektron, wodurch es an das Metall-Ion von Hämgruppen verschiedener Proteine binden und Enzyme inhibieren (Katalase, Zytochrom-c-Oxidase) oder aktivieren (Guanylatzyklase) kann. Die lösliche Guanylatzyklase, die die Bildung von cGMP katalysiert, ist das wichtigste Zielprotein von NO (NO/cGMP-Signalweg). cGMP als Effektormolekül von

NO moduliert direkt und indirekt zahlreiche Zielproteine, darunter Proteinkinase G, Ionenkanäle, Phosphodiesterasen, GPCRs, PLC, Tyrosinkinasen und Tyrosinphosphatasen. Neben der Interaktion mit Häm kann NO auch durch reversible S-Nitrosylierung Signalmoleküle aktivieren (Ras, Calcium-abhängige Kaliumkanäle) oder inaktivieren (eNOS, iNOS, GAPDH, Caspasen, L-Typ-Calciumkanäle) (Dudzinski *et al.* 2006).

NO kann über verschiedene Signalwege zahlreiche wichtige Funktionen wie Neurotransmission, unspezifische Immunabwehr und Gefäßtonus beeinflussen. Im Gefäßsystem ist NO ein wichtiger Regulator von vaskulärer Homöostase und antiatherogenen Prozessen und wahrscheinlich essentiell für die Funktion vaskulärer Progenitorzellen (Förstermann 2006b). Beispielsweise führt die NO/cGMP-vermittelte Aktivierung der Proteinkinase G in glatten Gefäßmuskelzellen zur Vasodilatation und in Thrombozyten zur Hemmung von Adhäsion und Aggregation (Dudzinski *et al.* 2006). Weiterhin wirkt NO durch Hemmung von Caspasen und Stimulation der Expression zytoprotektiver Gene wie Hsp70, Hämoxxygenase-1 und Bcl-2 (Kim *et al.* 2002) antiapoptotisch. Der NO/cGMP-Signalweg hat auch Einfluß auf das Migrationsverhalten von Zellen. Angiogenesefaktoren stimulieren in Endothelzellen die endogene Produktion von NO, das dann über cGMP-abhängige und -unabhängige Signalwege deren Migration und damit die Gefäßbildung fördert (Noiri *et al.* 1997; Cudmore *et al.* 2006). Dementsprechend zeigen eNOS-Knockoutmäuse eine beeinträchtigte Angiogenese (Mungrue *et al.* 2003). eNOS ist in migrierenden HUVEC überwiegend an der Front des Lamellipodiums lokalisiert (Bulotta *et al.* 2006). Es wird vermutet, daß die Bildung von NO an der Zellfront die Bildung funktioneller Integrin- α v β 3-Komplexe und die Interaktion mit der extrazellulären Matrix reguliert (Murohara *et al.* 1999). Bisher wurde eine Vermittler-Rolle für NO in der Migration von Endothelzellen jedoch nicht für alle Stimuli nachgewiesen. Es wurde gezeigt, daß NO für die durch VEGF ausgelöste Migration von Bedeutung ist, die Rolle von eNOS/NO in der S1P-induzierten Migration von Endothelzellen wird dagegen noch kontrovers diskutiert (Morales-Ruiz *et al.* 2001; Dudzinski *et al.* 2006).

1.4.4 Extrazellulärsignal-regulierte Kinasen 1 und 2

Mitogen-aktivierte Proteinkinasen (MAPKs) gehören zu den zentralen intrazellulären Signalmolekülen. Sie sind durch eine duale Phosphorylierungsstelle mit der Sequenz Thr-Xxx-Tyr gekennzeichnet und werden in drei Unterfamilien eingeteilt: extrazellulärsignal-regulierte Kinasen (ERKs) (Thr-Glu-Tyr), p38-MAPKs (Thr-Gly-Tyr) und c-JUN-N-Terminus-Kinasen (JNKs) (Thr-Pro-Tyr). MAPK bilden zusammen mit zwei vorgeschalteten Kinasen (MAPK-Kinase-Kinase (MAPKKK) und MAPK-Kinase (MAPKK)) eine Signalkaskade, die durch sequentielle Phosphorylierung letztlich zur Aktivierung der MAPKs führt. Zu den ERKs gehören ERK1, auch MAPK3 oder p44MAPK genannt, und ERK2, auch MAPK1 oder p42MAPK genannt. Sie werden überwiegend durch Wachstumsfaktoren aktiviert. Die MAPKKKs dieses Modules sind die Serin/Threonin-Kinasen A-Raf, B-Raf und Raf-1. Sie phosphorylieren die dual-spezifischen MAPKKs MAPK-ERK1/2-Kinase 1 und 2 (MEK1/2). Diese wiederum phosphorylieren ERK1/2 am Thr-Glu-Tyr-Motiv (Roux & Blenis 2004; Krens *et al.* 2006).

ERK1 und ERK2 werden in den meisten Geweben koexprimiert, zeigen jedoch deutliche Unterschiede im Expressionsniveau relativ zueinander (Lloyd 2006). Sie sind kompakte Serin/Threonin-Kinasen ohne regulatorische Domänen, autoinhibitorische Segmente und regulatorische Untereinheiten. Beide Kinasen bestehen aus einer N-terminalen und einer C-terminalen Domäne, die gemeinsam das aktive Zentrum formen. Aktivierungsschleife,

katalytische Schleife und Substraterkennungsstelle sind Teil der C-terminalen Domäne. Durch die Phosphorylierung an Thr202 und Tyr204 ändert sich die Konformation der Aktivierungsschleife, was nachfolgend zur Verbesserung der Stereochemie des aktiven Zentrums, Bildung der Substraterkennungsstelle, Dimerisierung und letztlich zur Aktivierung des Enzyms führt (Canagarajah *et al.* 1997).

Klassischerweise wird die ERK1/2-MAPK-Kaskade durch Rezeptortyrosinkinasen und G-Protein-gekoppelte Rezeptoren über die Aktivierung verschiedener Ras-Isoformen initiiert (Roux & Blenis 2004). Vermutlich tragen auch PI3Ks zur Ras-Aktivierung bei. PI3Ks, insbesondere die PI3K γ -Isoform, wurden beispielsweise für die G $\beta\gamma$ -induzierte Aktivierung der Ras/ERK1/2-MAPK-Kaskade verantwortlich gemacht (Hawes *et al.* 1996; Lopez-Illasaca *et al.* 1997). Weiterhin gibt es Hinweise darauf, daß PIP₃ mit Ras-Regulatorproteinen reagiert (Kranenburg & Moolenaar 2001) oder über die Rekrutierung von PDK-1 zur Phosphorylierung von PKC-Isotypen (Chou *et al.* 1998; Le Good *et al.* 1998) und zur PKC-abhängigen Aktivierung der Raf-1/MEK/ERK1/2-Kaskade führt. (Ueda *et al.* 1996; Schönwasser *et al.* 1998). G-Protein-gekoppelte Rezeptoren können auch über die Transaktivierung von Rezeptortyrosinkinasen eine Aktivierung der ERK1/2-MAPK-Kaskade induzieren (Wetzker & Böhmer 2003). Letzteres scheint vom Zell- und Rezeptortyp, der Rezeptordichte und der Ligandenkonzentration abhängig zu sein (Duckworth & Cantley 1997; Wennström & Downward 1999). Die Deaktivierung der ERK1/2-MAPK-Kaskade erfolgt über die Dephosphorylierung von ERK1/2 durch Ser/Thr-Phosphatasen, Tyrosinphosphatasen oder dual-spezifische Phosphatasen (Canagarajah *et al.* 1997). Zusätzlich können negative Rückkopplungsmechanismen die Aktivität von Raf-Kinasen verringern und somit die Stimulation der ERK1/2-MAPK-Kaskade herabsetzen (Ueki *et al.* 1994).

Bisher wurden 160 Substrate von ERK1/2 entdeckt. Außer Transkriptionsfaktoren gehören dazu Proteinkinasen, Proteinphosphatasen, Elemente des Zytoskeletts und Apoptoseregulatoren. Viele ERK1/2-Substrate befinden sich im Zellkern und regulieren Transkriptionsvorgänge, wodurch Proliferations- und Differenzierungsvorgänge gesteuert werden. Nach Stimulierung von Zellen kommt es daher zu einer signifikanten Akkumulation von phosphoryliertem ERK1/2 im Zellkern, wobei Mechanismen wie nukleäre Retention, Dimerisierung und Ablösung von zytoplasmatischen Verankerungen vermutlich eine Rolle spielen (Roux & Blenis 2004). Weitere ERK1/2-Substrate befinden sich an Membranen oder im Zytosol, wo sie Prozesse wie Translation, Mitose, Migration und Apoptose beeinflussen (Roux & Blenis 2004; Caunt *et al.* 2006; Yoon & Seger 2006). ERK1/2-Effektoren, die bei Migrationsprozessen eine Rolle spielen, sind unter anderem MLCK, Calpain und FAK. Letztere sind in den Abbau fokaler Adhäsionen involviert (Huang *et al.* 2004). ERK1/2 gehören zu den Schlüssel-Signalmolekülen der Angiogenese. Auch für die S1P-induzierte Bildung neuer Gefäße aus Endothelzellen ist die ERK1/2-Aktivierung essentiell (Miura *et al.* 2003). Es ist allerdings unklar, ob und inwieweit ERK1/2 dabei als Vermittler für die Migration fungieren. Die S1P-induzierte Aktivierung von ERK1/2 in Endothelzellen erfolgt über G_i-Proteine und Ras (Miura *et al.* 2003). Die Frage, ob und in welcher Form PI3Ks die Effekte von S1P auf die Ras/ERK1/2-MAPK-Kaskade regulieren, ist bisher noch offen.

1.4.5 Rho-GTPase Rac1

Die kleine GTPase Rac1 ist ein wichtiger Mediator S1P-induzierter Prozesse. Sie bildet gemeinsam mit Rac2 und Rac3 eine Untergruppe in der Familie der Rho-GTPasen. Rho-GTPasen haben Schlüsselfunktionen in der Kontrolle der Migration von Zellen, beispielsweise bei der Reorganisation des Zytoskeletts und der Regulation von Zell-Zell-

sowie Zell-Matrix-Kontakten, inne. Rac1 ist ubiquitär exprimiert, Rac2 überwiegend in hämatopoetischen Zellen und Rac3 vorrangig in Nervenzellen. Knockoutexperimente haben gezeigt, daß die Expression von Rac1 lebenswichtig ist (Gregg *et al.* 2003; McCarty *et al.* 2005; Cernuda-Morollon & Ridley 2006; Bustelo *et al.* 2007).

Kleine GTPasen zeichnen sich durch die alternierende Bindung der Nukleotide GDP oder GTP aus. Sie haben eine kompakte globuläre Struktur und einen Lipidanker am C-Terminus. An ihrer Oberfläche in unmittelbarer Nähe zur Nukleotid-Bindestelle befinden sich drei kurze Segmente (*P-loop*, *Switch I*, *Switch II*), die für eine unterschiedliche Proteinkonformation nach GDP- oder GTP-Bindung verantwortlich sind. GTPasen, die GTP gebunden haben, werden als aktiv bezeichnet, weil die Konformation in diesem Zustand die Interaktion mit Effektorproteinen ermöglicht (Corbett & Alber 2001; Linder & Deschenes 2007). Da die kleinen GTPasen Guaninnukleotide mit hoher Affinität binden, muß der Wechsel von GDP- zu GTP-gebundener Form durch GEFs katalysiert werden.

Rac wird im Zytoplasma durch Bindung von Guaninnukleotid-Dissoziations-Inhibitoren (GDIs) in einem inaktiven Zustand gehalten. GDIs stabilisieren den GDP-gebundenen Zustand der GTPase und verhindern deren Bindung an die Membran, indem sie an den prenylierten C-Terminus der GTPase binden. Nach Stimulierung von Zellen kommt es zur Dissoziation der GDIs, wodurch Rac wieder an die Membran binden kann, und zur Aktivierung von GEFs. Rac-GEFs können durch die Bindung an PIP₃ über ihre PH-Domänen, durch Phosphorylierung und/oder durch Interaktion mit regulatorischen Proteinen aktiviert werden (Schmidt & Hall 2002). Die Deaktivierung von GTP-Rac erfolgt durch seine intrinsische GTPase-Aktivität. Dieser Prozeß wird durch die Bindung von GAPs deutlich beschleunigt (Gregg *et al.* 2003).

Aktives Rac1 ist gradientenartig in migrierenden Zellen verteilt, mit der größten Konzentration im Bereich des Leitsaumes, wo es für die lokale Aktinpolymerisierung verantwortlich ist. Daran sind verschiedene Rac1-Effektormoleküle wie PAK, p140Sra1, IRSp53 und IQGAP1 beteiligt, die ihrerseits wiederum eine Reihe von Effektoren mit Einfluß auf das Zytoskelett regulieren (Watanabe *et al.* 2005; Moldovan *et al.* 2006). PAK phosphoryliert beispielsweise LIMK und führt über die LIMK-abhängige Hemmung von Cofilin zur Stabilisierung der Aktinfilamente. Weiterhin verhindert PAK die Aktivierung von Myosin im Lamellipodium durch Hemmung der MLCK, stabilisiert lokal Mikrotubuli durch Phosphorylierung von Stathmin (Bokoch 2003) und führt zur allosterischen Aktivierung der löslichen Guanylatzyklase (Settleman 2007). IRSp53 und p140Sra1 vermitteln dagegen die Rac-induzierte Aktivierung des Multi-Protein-WAVE-Komplexes, der wiederum zur Aktinpolymerisation durch den Arp2/3-Komplex führt (Ridley 2006), während IQGAP1 die Aktivität von Rac1 und Cdc42 erhöht und für die Quervernetzung von Aktinfilamenten im Leitsaum sorgt (Siegrist & Doe 2007).

Wichtige Rac1-Effektoren sind auch NOXO1 und NOXA1, die zytosolischen Komponenten der nicht-phagozytischen NAD(P)H-Oxidase. Durch Bindung an aktives Rac1 werden sie zur Plasmamembran rekrutiert, was zur lokalen Assemblierung und Aktivierung des vollständigen NAD(P)H-Oxidase-Komplexes führt. Dadurch kommt es zur Produktion von Superoxid-Anionen und anderen reaktiven Sauerstoffspezies, die ein wichtiger Modulator beim Umbau des Aktinzytoskeletts sind und zu einer Erhöhung der Migrationsgeschwindigkeit führen (Moldovan *et al.* 2006). Rac1 aktiviert weiterhin MAPKKs, die zur Stimulierung von p38- und JNK-MAPK-Kaskaden führen, Phospholipasen (z. B. PLC), Lipidkinasen (z. B. PI3Ks) und den Transkriptionsfaktor NF- κ B und kann auch auf diese Weise die Migration neben anderen Prozessen wie Proliferation, Differenzierung und Apoptose beeinflussen (Huang *et al.* 2004; Jaffe &

Hall 2005). Die Aktivierung von Rac1 ist sowohl in die S1P-induzierte Migration von Endothelzellen als auch in die S1P-initiierte Erhöhung der endothelialen Barrierefunktion einbezogen. Dabei ist noch unklar, wie S1P Rac1 aktiviert, welche Rac1-Effektoren an den Prozessen beteiligt sind und welchen Anteil die Rac1-vermittelten Mechanismen an der S1P-induzierten Antwort haben (Lee *et al.* 2006). Auch die Rolle der PI3Ks, insbesondere der verantwortlichen Isoformen, als Mediatoren der Rac-Aktivierung sowie die Wechselwirkungen von Rac1 und PI3Ks sind bisher nur unvollständig aufgeklärt.

1.5 Fragestellung

Durch die Stimulation von Endothelzellen mit S1P werden Signalkaskaden in Gang gesetzt, die entscheidend an Angiogeneseprozessen beteiligt sind. Diese Prozesse führen sowohl unter physiologischen (Wachstum) als auch unter pathologischen Bedingungen (Tumore, Ischämie, Wundheilung) zur Vaskularisierung von Geweben. Um neue Therapieansätze zur Stimulierung oder Hemmung angiogener Prozesse entwickeln zu können, müssen die zugrunde liegenden Signalwege detailliert verstanden werden.

Die S1P-induzierte Migration von Endothelzellen ist eine essentielle Komponente der Angiogenese. Ihre genauen Mechanismen sind jedoch nur unvollständig bekannt. Literaturdaten weisen auf eine Beteiligung von PI3Ks, Akt, eNOS, Rac und ERK1/2 als verantwortliche Signalproteine hin, der Beitrag der einzelnen Signalwege und die Interaktionen der einzelnen Signalmoleküle wurden bisher aber wenig charakterisiert. So wird beispielsweise die Rolle von PI3Ks und Akt als Mediatoren von Rac- oder ERK1/2-Aktivierung kontrovers diskutiert. Klasse-I-PI3Ks, die eine Schlüsselstellung in S1P-induzierten Signaltransduktionsketten einnehmen, existieren in verschiedenen Isoformen. Isoform-spezifische Wirkungen der PI3Ks in Endothelzellen wurden aber bisher ebenfalls kaum untersucht, obwohl dies eine Voraussetzung für den Einsatz Isoform-spezifischer Hemmstoffe ist. Letztere lassen geringere Nebenwirkungen erwarten als Inhibitoren, die mit allen Isoformen reagieren und sind deshalb aussichtsreiche Kandidaten zur Hemmung pathologischer Angiogeneseprozesse wie sie beispielsweise beim Wachstum von Tumoren auftreten.

Ziel der Arbeit ist es, S1P-induzierte Signalwege, die zur Aktivierung von Akt, eNOS, Rac und ERK1/2 führen, und deren Bedeutung für die Vermittlung der Migration von Endothelzellen näher zu untersuchen. Im Mittelpunkt der Arbeit soll dabei die Untersuchung der Rolle von PI3Ks als Vermittler der genannten Signalwege stehen. Da S1P über G_i-Protein-gekoppelte Rezeptoren Signale transduziert, sollen die Experimente auf die G_i-Protein-sensitiven PI3K-Isoformen β und γ fokussieren und die Funktion dieser beiden Isoformen in den zur Migration führenden Signalkaskaden analysieren.

Um die beschriebene Fragestellung zu klären, sollen sowohl pharmakologische als auch gentechnische Methoden zum Einsatz kommen. So sollen im Rahmen dieser Arbeit die neuen Isoform-spezifischen Inhibitoren für PI3K β , PI3K γ , Akt1/2 und Rac1 erstmalig in humanen Endothelzellen verwendet werden. Als gentechnische Methode soll die RNA-Interferenz eingesetzt werden, um die Expression von PI3K β und PI3K γ zu minimieren. Als Voraussetzung für diesen Teil der Arbeit sollen Transfektionsmethoden für siRNA in Endothelzellen geprüft und optimiert werden sowie eine geeignete PI3K γ -spezifische siRNA entworfen und getestet werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Zelltypen

- HEK293::p110 γ -Zellen: Transformierte humane embryonale Nierenzellen (*human embryonic kidney 293*), die eine Expressionskassette für p110 γ stabil ins Genom integriert haben
- HUVEC: Humane Umbilikalvenen-Endothelzellen (*human umbilical cord vein endothelial cells*)

2.1.2 DNA-Oligonukleotide

- PI3K β -RT-PCR-Primer (Ducluzeau *et al.* 2001):
5' -CTGTGCTGGCTACTGTGTA-3' (sense)
5' -TAGTAGTCCAGCTTCCCTG-3' (antisense)
- p101-RT-PCR-Primer:
5' -CTGGGCTGTGTCTGAACTG-3' (sense)
5' -GTGGTGTAGGCACTGTGAG-3' (antisense)
- p87-RT-PCR-Primer:
5' -TGGTCATTGCCGAACAGAAC-3' (sense)
5' -TCAGTGGACAGCACAGAAAC-3' (antisense)

2.1.3 siRNA-Duplexe

- Kontroll-siRNA: „Control (*non-sil.*) siRNA“ 1022076 (Qiagen GmbH, Hilden)
5' -UUCUCCGAACGUGUCACGUTT-3' (sense)
5' -ACGUGACACGUUCGGAGAATT-3' (antisense)
- p110 β -siRNA: „Hs_PIK3CB_5 Validated siRNA“ SI02622214 (Qiagen GmbH, Hilden)
- p110 γ -siRNA (Proligo France SAS, Paris, Frankreich)
Design: *siRNA at Whitehead*, #1
5' -GAUUGCCAACAACUGCAUCTT-3' (sense)
5' -GAUGCAGUUGUUGGCAAUCTT-3' (antisense)
Design: *siRNA at Whitehead*, #2
5' -GGGAGAAGACCAAGGAAGCTT-3' (sense)
5' -GCUUCCUUGGUCUUCUCCCTT-3' (antisense)
Design: *siRNA at Whitehead*, #3
5' -UUGGUCCAGGCUGUGAAAUTT-3' (sense)
5' -AUUUCACAGCCUGGACCAATT-3' (antisense)
Design: *siRNA at Whitehead*, #4
5' -CCAUACCAUGAUAGCGCCCTT-3' (sense)
5' -GGGCGCUAUC AUGGUAUGGTT-3' (antisense)

Design: Dharmacon siDESIGN Center, „D3g“
 5' -GCAUAUCCUAAGCUAUUUATT-3' (*sense*)
 5' -UAAAUAGCUUAGGAUAUGCTT-3' (*antisense*)

2.1.4 Antikörper

Antigen	Typ	Verdünnung	Bezeichnung	Bezugsquelle
Akt	Kaninchen, polyklonal	1:1000	#9272	Cell Signaling Technology Inc., Danvers, USA
Akt1	Maus, monoklonal	1:1000	sc-5298	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Heidelberg
eNOS	Maus, monoklonal	1:1000	#610297	BD Transduction Laboratories™, BD Biosciences – Pharmingen, Heidelberg
ERK1/2	Maus, monoklonal	1:10000	#9107	Cell Signaling Technology Inc., Danvers, USA
Kaninchen-IgG	Ziege, polyklonal, peroxidase-konjugiert	1:2000	#7074	Cell Signaling Technology Inc., Danvers, USA
Kaninchen-IgG	Ziege, polyklonal, peroxidase-konjugiert	1:5000	074-1506	Kirkegaard & Perry Laboratories, Inc., Gaithersburg, Maryland, USA
Maus-IgG	Ziege, polyklonal, peroxidase-konjugiert	1:10000	074-1806	Kirkegaard & Perry Laboratories, Inc., Gaithersburg, Maryland, USA
p110 β	Kaninchen, polyklonal	1:1000	sc-602	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Heidelberg
p110 γ	Maus, monoklonal	1:100	Anti-p110 γ	Institut für Molekulare Zellbiologie, FSU Jena
Phospho-Akt (Ser473)	Kaninchen, polyklonal	1:1000	#9271	Cell Signaling Technology Inc., Danvers, USA
Phospho-eNOS (Ser1177)	Kaninchen, polyklonal	1:1000	#9571	Cell Signaling Technology Inc., Danvers, USA
Phospho-Erk1/2 (Thr202/Tyr204)	Maus, monoklonal	1:4000	#9106	Cell Signaling Technology Inc., Danvers, USA

Antigen	Typ	Verdünnung	Bezeichnung	Bezugsquelle
Rac1	Maus, monoklonal	1:1000	#610651	BD Transduction Laboratories™, BD Biosciences – Pharmingen, Heidelberg
β-Aktin	Maus, monoklonal	1:5000	A5441	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim

2.1.5 Inhibitoren und Stimulanzen

Name	Bezugsquelle
1,2-bis(o-Aminophenoxy)ethan- N,N,N',N'-tetraacetylsäure-tetrakis (acetoxymethylester) (BAPTA-AM)	Alexis Corp., Lausen, Schweiz
AG1478	Calbiochem®, EMD Biosciences Inc., La Jolla, USA
Akt1/2 Kinase Inhibitor	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
AS-252424	Australian Centre for Blood Diseases, Monash University, AMREP, Melbourne, Victoria, Australia
D-erythro-Sphingosin-1-phosphat (S1P)	Calbiochem®, EMD Biosciences Inc., La Jolla, USA
Genistein	Calbiochem®, EMD Biosciences Inc., La Jolla, USA
IC87114	Australian Centre for Blood Diseases, Monash University, AMREP, Melbourne, Victoria, Australia
InSolution™ Rac1 Inhibitor NSC- 23766	Calbiochem®, EMD Biosciences Inc., La Jolla, USA
L-N ^G -Nitroarginin-Methylester (L-NAME)	Alexis Corp., Lausen, Schweiz
Na ₄ P ₂ O ₇	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
NaF	VEB Chemiewerk Nünchritz, Dohna
PD-98059	Calbiochem®, EMD Biosciences Inc., La Jolla, USA
Pertussistoxin	Alexis Corp., Lausen, Schweiz
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Protease-Inhibitor-Cocktail (PIC)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
SU5614	Calbiochem®, EMD Biosciences Inc., La Jolla, USA

Name	Bezugsquelle
TGX-221	Australian Centre for Blood Diseases, Monash University, AMREP, Melbourne, Victoria, Australia
Wortmannin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim

2.1.6 Zellkultur- und Transfektionsreagenzien

Name	Bezugsquelle
<i>Dulbecco's modified Eagle medium</i> (D-MEM)	Life Technologies GmbH, Eggenstein-Leopoldshafen
<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium: F-12 Nutrient Mixture</i> (D-MEM/F-12) 1:1 Mixture	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
<i>Endothelial cell growth supplement</i> (ECGS)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Fötales Kälberserum (FKS)	Cambrex Bio Science Verviers SPRL, Verviers, Belgien
Gelatine	ICN Biomedicals GmbH, Eschwege
<i>Hank's Balanced Salt Solution</i> (HBSS)	Cambrex Bio Science Verviers SPRL, Verviers, Belgien
Heparin-Natrium	Hoffmann-La Roche AG, Grenzach-Wyhlen
Humanserum	Cambrex Bio Science Verviers SPRL, Verviers, Belgien
HUVEC Nucleofector® Kit	amaxa AG, Köln
Kollagenase II	Worthington Biochemical Corporation, Lakewood, USA
L-Glutamin	ICN Biomedicals GmbH, Eschwege
Medium 199 (M199)	Cambrex Bio Science Verviers SPRL, Verviers, Belgien
N,N-Bis-(2-hydroxyethyl)-2-aminoethanesulfonsäure (BES)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Penicillin/Streptomycin	Cambrex Bio Science Verviers SPRL, Verviers, Belgien
SAINT-MIX / SAINT-RED	Synvolux Therapeutics B.V., Groningen, Niederlande
Trypsin-EDTA (0,05 %/0,02 %)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim

2.1.7 Reagenzien für RNA-Analytik

Name	Bezugsquelle
100 bp <i>DNA Ladder</i>	Invitrogen Corporation, Carlsbad, USA
Agarose	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Chloroform	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Isopropanol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
QIAGEN® OneStep RT-PCR Kits	QIAGEN GmbH, Hilden
TRIZOL®	Invitrogen Corporation, Carlsbad, USA

2.1.8 Reagenzien für Zell-Lyse und Proteinanalytik

Name	Bezugsquelle
2-Mercaptoethanol (ME)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Acrylamid 4K-Lösung Mix 37,5:1	AppliChem GmbH, Darmstadt
Albumin Fraktion V	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Amersham Hyperfilm™	GE Healthcare Ltd., Little Chalfont, GB
Ammoniumpersulfat	AppliChem GmbH, Darmstadt
Bromphenolblau (BPB)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
<i>DC™</i> Protein Assay	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
DL- Dithiothreitol (DTT)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
<i>ECL (Plus) Western Blotting Detection System</i>	GE Healthcare Ltd., Little Chalfont, GB
Entwickler und Fixiererlösung	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Ethylenglycol bis (2-aminoethylether)-N,N,N',N'- tetraacetat (EGTA)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Glutathion-Sepharose™ 4B (GSH-Sepharose)	GE Healthcare Ltd., Little Chalfont, GB
Glycerin	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Guanosin-5'-diphosphat (GDP)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
<i>High-Range Rainbow™ Molecular Weight Markers</i>	GE Healthcare Ltd., Little Chalfont, GB
Immobilon-P-Transfer-Membran	Millipore Corporation, Bedford, USA
Magermilchpulver	AppliChem GmbH, Darmstadt
Methanol	AppliChem GmbH, Darmstadt

Name	Bezugsquelle
N,N,N,N-Tetramethylethylenediamine (TEMED)	AppliChem GmbH, Darmstadt
Nonidet® P40 (NP40)	Calbiochem®, Calbiochem-Novabiochem Corp., La Jolla, USA
Protein A-Sepharose®	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
<i>Sodiumdodecylsulfate</i> (SDS)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris)	AppliChem GmbH, Darmstadt
Triton X-100	FERAK Laborat GmbH, Berlin
Tween® 20	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg

2.1.9 Reagenzien für die cGMP-Bestimmung

Name	Bezugsquelle
cGMP – [³ H] Biotrak Assay	Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg
Isobutylmethylxanthin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
L-Arginin	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
L-Sepiapterin	Alexis Corp., Lausen, Schweiz
Na ₂ CO ₃	VEB Laborchemie Apolda
NaOH	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe,
Superoxid-Dismutase	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim

2.1.10 Reagenzien für Migrationsassays

Name	Bezugsquelle
BD Falcon™ <i>Cell Culture Insert Companion Plates</i>	Becton Dickinson and Company, Franklin Lakes, USA
BD Falcon™ <i>Cell Culture Inserts</i> , 8 µm Porengröße	Becton Dickinson and Company, Franklin Lakes, USA
ENTELLAN®	Merck KGaA, Darmstadt
Hämatoxylin	Dako Deutschland GmbH, Hamburg
Paraformaldehyd	VEB Laborchemie Apolda
SuperFrost® Objektträger und Deckgläser	Gerhard Menzel Glasbearbeitungswerk GmbH & Co. KG, Braunschweig

2.1.11 Weitere Reagenzien und Materialien

Name	Bezugsquelle
Bovines Serumalbumin (BSA)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe,
CaCl ₂	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
Ethanol	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Glukose	Merck KGaA, Darmstadt
Humanserumalbumin (HSA)	Bayer Vital GmbH, Leverkusen,
KCl	VEB Laborchemie Apolda
MgSO ₄	VEB Laborchemie Apolda
N-2-Hydroxyethylpiperazin-N-2-Ethansulfonsäure (HEPES)	AppliChem GmbH, Darmstadt
Na ₂ HPO ₄	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

2.2.1.1 Kultivierung von HEK293::p110 γ -Zellen

Die transgenen HEK-Zellen wurden freundlicherweise von Dr. Luchezar Karagyozev, Institut für Molekulare Zellbiologie der FSU Jena, zur Verfügung gestellt. Sie wurden in D-MEM/F-12 mit 10 % FKS, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. Zur Passage oder Aussaat wurden die Zellen mit Hilfe von Trypsin-EDTA-Lösung abgelöst.

2.2.1.2 Präparation und Zellkultur von HUVEC

HUVEC wurden mittels 0,1%iger Kollagenaselösung aus humanen Nabelschnurvenen isoliert und in Wachstumsmedium aufgenommen. Die Kultivierung erfolgte in gelatinebeschichteten 75-cm²-Zellkulturflaschen bei 37 °C und 5 % CO₂. Die Ablösung der Zellen zur Passage oder Aussaat erfolgte mittels Trypsin-EDTA-Lösung. Zur Aussaat wurden ausschließlich Zellen der ersten Subkultur verwendet.

Wachstumsmedium	
80 %	M199
15 %	FKS
5 %	Humanserum
7,5 µg/ml	ECGS
7,5 U/ml	Heparin
100 U/ml	Penicillin
100 µg/ml	Streptomycin
680 µM	Glutamin

2.2.2 RNA-Interferenz durch Transfektion mit siRNA

Zur Untersuchung von Signalwegen ist es sowohl erforderlich, Signalproteine durch pharmakologische Wirkstoffe zu hemmen als auch deren Expression zu vermindern. Zusätzlich zu genetischen Methoden, die nur im Tiermodell anwendbar sind (knockout), hat sich dabei in den letzten 10 Jahren die Anwendung der RNA-Interferenz mehr und mehr etabliert.

RNA-Interferenz (RNAi) bezeichnet den Prozeß der Repression der Genexpression durch doppelsträngige RNA-Helices mit einer Länge von ca. 19 Nukleotiden und mit zwei überhängenden Nukleotiden an den 3'-Enden beider Einzelstränge. Dieses Phänomen ist in Pilzen, Pflanzen und Tieren verbreitet und hat sich in der Evolution als antiviraler Verteidigungsmechanismus entwickelt. Darüber hinaus wird der RNAi-Mechanismus von Zellen durch die Synthese spezifischer pre-miRNA auch für die Feinregulierung der Expression bestimmter Gene oder für die gewebespezifische Repression von Genen genutzt (Lai 2005; Kim & Rossi 2007; Rana 2007).

Die Bildung der charakteristischen RNA-Helices erfolgt durch sogenannte *Dicer*-Ribonukleasen. Sie schneiden lange doppelsträngige Fremd-RNA oder kurze haarnadel-förmige pre-miRNA in kurze doppelsträngige Fragmente, die als siRNA beziehungsweise miRNA bezeichnet werden. siRNA und miRNA sind strukturell identisch. Sie dienen als sequenzspezifische Sonde für den Proteinkomplex RISC (*RNA-induced silencing complex*). Dessen Kernkomponente ist ein Ago-Protein (Protein der Argonauten-Familie), das siRNA oder miRNA bindet und das Andocken von RISC an die Ziel-mRNA vermittelt. Das thermodynamisch instabilere Ende der kurzen Duplex-RNA wird in der C-terminalen Domäne von Ago (PIWI) positioniert, wo das phosphorylierte 5'Nukleotid dieses Endes in einer Tasche gebunden wird. Der so verankerte Strang wird dadurch als künftiger Führungsstrang festgelegt. Das thermodynamisch stabilere Ende wird in der N-terminalen Domäne von Ago (PAZ) positioniert, wo die beiden 3'-überhängenden Nukleotide des Führungsstranges gebunden werden. Die gebundene Duplex-RNA wird entwunden und der nicht verankerte Passagierstrang entfernt. Trifft RISC nun auf die Ziel-mRNA, erfolgt zunächst eine Basenpaarung zwischen mRNA und den Nukleotiden 2-7 des Führungsstranges, der sogenannten *seed sequence*. Die Führungsstrang-Zielsequenz-Duplexbildung schreitet dann in Richtung 3'-Ende des Führungsstranges fort. Dabei kommt es wahrscheinlich zu einer Konformationsänderung von Ago, wodurch sich das 3'-Ende des Führungsstranges von der PAZ-Domäne löst und ebenfalls an die Ziel-mRNA bindet. Der Abschnitt des mRNA-Stranges, der in die Duplexbildung involviert ist, wird dadurch in einem Bereich der PIWI-Domäne positioniert, die bei der Isoform Ago2 katalytisch aktiv ist. In diesem Fall wird die mRNA an dieser Stelle geschnitten, über eine Helikase vom Führungsstrang abgelöst und über zelluläre Exonukleasen weiter

abgebaut. Wenn siRNA über Ago1/3/4 an RISC gebunden wurde, oder wenn die Basenpaarung zwischen Führungsstrang und mRNA unvollständig ist, wie es meist bei miRNA auftritt, kann die Ziel-mRNA nicht gespalten werden. Dadurch bleibt RISC an die mRNA gebunden und stört auf diese Weise das Ablesen der mRNA durch die Ribosomen. Zusätzlich kann es zum Transfer der gebundenen mRNA in sogenannte *processing bodies* kommen, wo sie entweder abgebaut oder gelagert wird (Meister *et al.* 2004; Parker & Barford 2006; Kim & Rossi 2007; Rana 2007). Als Folge des Abbaus oder des gestörten Ablesens der Ziel-mRNA verringert sich die Neusynthese des Zielproteins und führt bei gleich bleibender Abbaurate zu einer allmählichen Abnahme der Zielproteinmenge, bis ein neues Gleichgewicht hergestellt ist. Abbildung 3 zeigt ein Modell für den RNAi-Mechanismus.

In der molekularbiologischen Forschung wird RNAi zur selektiven Verringerung der Expression von Proteinen genutzt. Das ist besonders wichtig, wenn keine Isoform-spezifischen Inhibitoren vorhanden sind, wenn neben enzymatischen Funktionen auch Adapterfunktionen eines Proteins untersucht werden sollen oder wenn die Zellen durch einen speziellen Gen-Knockout nicht lebensfähig sind. In Säugerzellen ist dabei zu beachten, daß das Einbringen langer doppelsträngiger RNA die sogenannte Typ-I-Interferonantwort auslöst (Kim & Rossi 2007; Rana 2007), wodurch es zu einer allgemeinen Inhibition der Translationsinitiation, Wachstumsstop und Apoptose kommt (Perry *et al.* 2005). Daher verwendet man in diesen Zellen entweder chemisch synthetisierte siRNA oder DNA-Vektoren, die zur Expression von miRNA-ähnlicher, haarnadelförmiger RNA (*short hairpin* RNA) führen (Kim & Rossi 2007). Synthetische siRNA ist leichter zu dosieren und zu transfizieren, aber ihre Wirkung ist transient. In Säugerzellen hält die Suppression der Genexpression durch synthetische siRNA maximal eine Woche an, was unter anderem von der Zellteilungsrate und der Halbwertszeit des Zielproteins abhängt (Scherr & Eder 2007). Zur Transfektion von synthetischer siRNA kommen verschiedene Methoden zur Anwendung (Calciumphosphatmethode, Elektroporation, Lipofektion).

2.2.2.1 Calciumphosphatmethode

Die Transfektion von siRNA in transgene HEK-Zellen erfolgte mit der Calciumphosphatmethode. Am Tag vor der Transfektion wurden die Zellen in 24-Well-Gewebe-kulturplatten ausgesät (200 000/Well), so daß am Transfektionstag ca. 60 % Konfluenz vorlag. Zuerst wurde das Medium durch 500 µl Transfektionsmedium (1/3 D-MEM/F-12 mit 10 % FKS, 2/3 D-MEM mit 10 % FKS) ersetzt. Dann wurden die Transfektionsansätze hergestellt, für 15 min inkubiert und 50 µl davon je Well zugegeben (0,74 µg siRNA/Well). Nach 5 h Inkubation bei 3 % CO₂ wurde das Transfektionsmedium abgesaugt und durch 500 µl D-MEM/F-12 mit 10 % FKS ersetzt. Drei Tage nach der Transfektion wurden die Zellen analysiert. Das Plasmid pECFP-EYFP wurde freundlicherweise von Dr. Tzvetanka Bondeva, AG Nephrologie (KIM III) am Forschungszentrum Lobeda der FSU Jena, zur Verfügung gestellt und diente zur Überprüfung der Transfektionseffizienz durch Fluoreszenzmikroskopie.

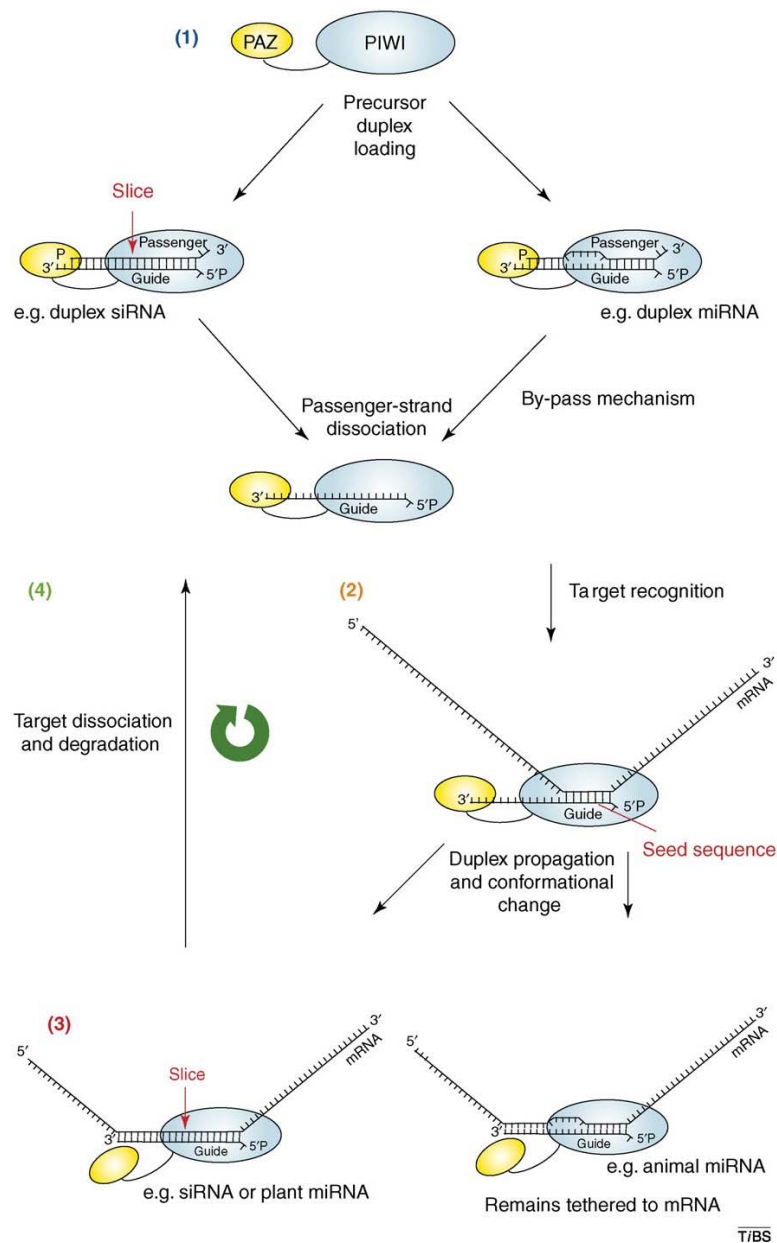


Abbildung 3: Modell für den molekularen Mechanismus der RNA-Interferenz (Parker & Barford 2006)

(1) Bindung des Führungsstranges der Duplex-siRNA oder miRNA an Ago. Ago-Proteine sind Bestandteil von RISC (*RNA-induced silencing complex*) und besitzen eine N-terminale PAZ-Domäne zur Bindung des Führungsstranges am 3'-Ende und eine C-terminale PIWI-Domäne zur Bindung des Führungsstranges am 5'-Ende. Die PIWI-Domäne von Ago2 besitzt RNase-Aktivität und kann den Passagierstrang bei vollständiger Duplexbildung schneiden. Die Duplex-RNA wird schließlich entwunden und der Passagierstrang entfernt. (2) Zielerkennung und Konformationsänderung. Die Ziel-mRNA-Erkennung erfolgt über die *seed sequence* im Führungsstrang. Während des Fortschreitens der Duplexbildung kommt es zur Konformationsänderung von Ago, wodurch sich das 3'-Ende des Führungsstranges von der PAZ-Domäne löst. (3) mRNA-Abbau oder -Blockade. Die vollständige Duplexbildung mit siRNA platziert den Doppelstrangbereich vor die katalytisch aktive Region der PIWI-Domäne von Ago2. Die mRNA wird geschnitten und vom Führungsstrang abgelöst. Kann die mRNA wegen unvollständiger Basenpaarung mit miRNA nicht geschnitten werden, bleibt der Protein-RNA-Komplex gebunden. (4) Recycling. Nach dem erfolgreichen Schneiden der mRNA löst sich der Komplex aus Ago2 und Führungsstrang von der mRNA und kann erneut komplementäre mRNA binden und schneiden.

Transfektionsansatz	
140 mM	NaCl
125 mM	CaCl ₂
25 mM	BES
0,75 mM	Na ₂ HPO ₄
20 µg/ml	Plasmid pECFP-EYFP
14,8 µg/ml	siRNA

2.2.2.2 Elektroporation mittels Nucleofector™ I

Die Methode der Elektroporation wurde für den Transfer der siRNA in HUVEC eingesetzt. Dafür wurden 80 % konfluente die Zellen mittels Trypsin-EDTA von der Zellkulturflasche abgelöst und in Medium (M199 mit 10 % FKS) aufgenommen. Die Zellen wurden sedimentiert (6 min, 500 x g, Raumtemperatur (RT)), in Waschpuffer (HEPES-Puffer) aufgenommen und dann mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer gezählt. Je Transfektion wurden 1×10^6 Zellen eingesetzt. Die erforderliche Menge Zellen wurde pelletiert und in „*HUVEC Nucleofector Solution*“ resuspendiert (1×10^7 /ml). 100 µl der Zellsuspension wurden mit 4 µg siRNA versetzt und in eine Elektroporationsküvette transferiert. Direkt nach der Elektroporation mit dem Gerät Nucleofector™ I (amaxes AG, Köln) unter Verwendung des Programms U-01 wurden 400 µl Wachstumsmedium (siehe oben) zugegeben und die gesamte Zellsuspension in 60-mm-Gewebekulturschalen mit 3 ml Wachstumsmedium überführt. 6 h später wurde das Medium durch frisches Wachstumsmedium ersetzt. Drei Tage später wurden die Zellen in den beschriebenen Experimenten eingesetzt.

HEPES-Puffer (pH 7,4)	
145 mM	NaCl
10 mM	HEPES
10 mM	Glukose
5 mM	KCl
1 mM	MgSO ₄

2.2.2.3 Transfektion mittels SAINT-RED

Als zweite Methode zum Transfer von siRNA in HUVEC wurde die Transfektion mit Hilfe von SAINT-RED (*Synthetic, Amphiphilic, Interactive – RNAi-Enhanced Delivery*) eingesetzt. SAINT-RED ist eine Mischung aus den amphiphilen Lipiden N-methyl-4-(dioleoyl)methylpyridiniumchlorid (SAINT-18) und Dioleoylphosphatidylethanolamin. Es bildet mit siRNA Lipoplexe, die durch Clathrin-vermittelte Endozytose von den Zellen aufgenommen werden. Die hexagonale Morphologie der Lipoplexe sorgt dann für eine effiziente Freisetzung der siRNA aus den Endosomen.

HUVEC wurden einen Tag vor der Transfektion in 6-Well-Gewebekulturplatten oder 30-mm-Gewebekulturschalen ausgesät (180 000/Well). Am Tag der Transfektion waren sie ca. 50 % konfluent. Je Well wurden Lipoplexe aus 15 nmol SAINT-RED und 1 µg siRNA nach Herstellerangaben zubereitet, mit 800 µl Medium (M199 mit 0,25 % HSA) verdünnt und zu den Zellen gegeben. Nach 3 bis 4 h wurden weitere 2 ml Wachstumsmedium (siehe oben) zugegeben. Drei Tage nach der Transfektion wurden die Zellen für

weiterführende Experimente verwendet. Neben der Standardbedingung (1 µg siRNA/30-mm-Well) wurden auch 0,5 und 2 µg siRNA/30-mm-Well verwendet. Das Verhältnis SAINT-RED zu siRNA war dabei immer gleich (15 nmol/1 µg). Bei Einsatz von 60- und 90-mm-Gewebekulturschalen wurde die Menge der Reagenzien je Schale entsprechend der Volumenverhältnisse angepaßt.

2.2.3 RNA-Analytik

2.2.3.1 RNA-Isolation

Die RNA-Isolation aus HUVEC erfolgte mit Hilfe von TRIZOL®. Dazu wurden HUVEC auf 60-mm-Gewebekulturschalen nach Absaugen des Mediums durch Zugabe von 800 µl TRIZOL® lysiert. Mittels Zellschaber und Pipette wurde das Lysat in ein 1,5-ml-Reaktionsgefäß überführt und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Zugabe von 160 µl Chloroform wurde das Gefäß 15 Sekunden kräftig geschüttelt und dann für 3 min bei Raumtemperatur stehen gelassen. Anschließend wurde das Reaktionsgefäß für 15 min bei 12 000 x g und 4 °C zentrifugiert. Dabei kommt es zur Separation von drei Phasen. Die untere Phase (Phenol/Chloroform) enthält die Proteine, die Interphase enthält DNA und in der oberen, wäßrigen Phase befindet sich die RNA. Die obere Phase wurde dann in ein neues 1,5-ml-Reaktionsgefäß überführt und zur Fällung der RNA mit 400 µl Isopropanol vermischt. Nach 10 min Inkubation bei Raumtemperatur folgte ein 10minütiger Zentrifugationsschritt bei 12 000 x g und 4 °C. Das RNA-Pellet wurde mit 70%igem Ethanol gewaschen und für 5 bis 10 min luftgetrocknet. Dann wurde die RNA in RNase-freiem Wasser gelöst und für 10 min auf 60 °C erhitzt. Die Konzentration der RNA wurde durch Messung der Extinktion in Küvetten mit 1 cm Durchmesser bei 260 nm bestimmt. Eine Extinktionseinheit entspricht dabei einer RNA-Konzentration von 40 µg/ml.

2.2.3.2 Reverse Transkription und PCR (*polymerase chain reaction*)

Reverse Transkription und PCR wurden unter Verwendung des QIAGEN® OneStep RT-PCR Kits und des Thermocyclers „*Personal Cycletm*“ (Biometra® biomedizinische Analytik GmbH, Göttingen) durchgeführt. Ein 50-µl-Reaktionsansatz enthielt außer den Komponenten des RT-PCR-Kits die Sense- und Antisense-Primer für das entsprechende Gen (beide 0,5 µM) und 1 µg Gesamt-RNA. Die Reaktion wurde mit einer 30minütigen Inkubation bei 50 °C begonnen. Während dieser Zeit erfolgte die reverse Transkription des Zielgenes. Danach wurde das Reaktionsgemisch auf 95 °C erhitzt, wodurch die Transkriptasen deaktiviert und die HotStarTaq™ DNA-Polymerase aktiviert wurde. Anschließend folgten 30 Zyklen von Doppelstrangdenaturierung (1 min, 95 °C), Primeranlagerung (1 min, 55 °C) und Polymerisation (1 min, 72 °C) zur Amplifizierung des DNA-Fragments. Zum Abschluß der Reaktion wurde der Ansatz für 10 min auf 72 °C erhitzt, um restliche unvollständige PCR-Produkte fertig zu stellen.

2.2.3.3 Agarose-Gelelektrophorese

Die Auftrennung der DNA-Fragmente erfolgte mittels 1%iger Agarose-Gele mit Ethidiumbromid (0,1 µg/ml) in Tris-Azetat-EDTA-Puffer (40 mM Tris, 20 mM Essigsäure, 1 mM EDTA). Jedes 50-µl-Reaktionsgemisch wurde durch Zugabe von 12,5 µl Gel-Ladepuffer (25 % Glycerin, 50 mM EDTA, 50 mM Tris, 0,05 % BPB) für die Elektrophorese vorbereitet. Davon wurden je Probe 15 µl in eine Geltasche gegeben. Zur

Abschätzung der Größe der PCR-Produkte wurde parallel ein DNA-Größenstandard (*100 bp DNA Ladder*) aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte in einer horizontalen Elektrophoreseapparatur (Prod. Nr. 960699, Biometra® biomedizinische Analytik GmbH, Göttingen; Elektrodenabstand: 15,5 cm) für 50 min bei einer konstanten Spannung von 120 V. Danach wurden die DNA-Banden mit Hilfe von UV-Licht, das zur Fluoreszenz des interkalierenden Ethidiumbromids führt, sichtbar gemacht und fotografiert.

2.2.4 Inhibition von Signalwegen

Die Aktivierung von G_i-Proteinen wurde mittels Pertussistoxin gehemmt. Pertussistoxin katalysiert die ADP-Ribosylierung von heterotrimeren G_i-Proteinen an der α -Untereinheit. Dadurch können diese nicht mehr vom Rezeptor gebunden und aktiviert werden (Fields & Casey 1997). Damit sind sowohl G α_i -vermittelte als auch G $\beta\gamma$ -vermittelte Signalwege blockiert.

Für die Untersuchung der Rolle von Tyrosinkinasen wurden in dieser Arbeit Genistein, ein Phytoöstrogen und Inhibitor vieler Tyrosinkinasen (Peterson 1995), sowie die selektiven Inhibitoren AG1478 und SU5614 eingesetzt. Das Tyrphostin AG1478 ist ein kompetitiver Inhibitor für die ATP-Bindestelle in der Kinase-Domäne des EGF-Rezeptors (Ellis *et al.* 2006) während das Indolinon-Derivat SU5614 einen kompetitiven Inhibitor für die ATP-Bindestelle der Rezeptortyrosinkinasen FLT3, KIT, VEGF- und PDGF-Rezeptor darstellt (Sun *et al.* 1998; Spiekermann *et al.* 2003).

PI3Ks wurden in den hier durchgeführten Experimenten mit dem allgemeinen PI3K-Inhibitor Wortmannin, aber auch mit Isoform-spezifischen Inhibitoren gehemmt. Der Pilzmetabolit Wortmannin bindet kovalent an alle PI3Ks, blockiert dadurch die Substratbindung und deaktiviert zusätzlich eine für den Katalyseprozeß wichtige Aminosäure (Wymann *et al.* 1996). Die PI3K-Isoform-selektiven Substanzen TGX-221, AS-252424 und IC87114 sind kompetitive Inhibitoren im Bereich der ATP-Bindestelle von PI3K β , PI3K γ und PI3K δ (Hawkins *et al.* 2006) und erlauben die Untersuchung der Rolle der einzelnen Isoformen in den zu untersuchenden Signaltransduktionsketten.

Für die Untersuchung der Rolle von Akt stand ein Akt1/2-Inhibitor zur Verfügung. Er wirkt als allosterischer Inhibitor für die Akt-Isoformen Akt1 und Akt2. Die Bindung des Inhibitors erfolgt vermutlich im Bereich der PH-Domäne und unterstützt die inaktive Konformation der Kinase (Barnett *et al.* 2005).

Die Bedeutung der eNOS für die S1P-induzierte Migration wurde mit dem L-Arginin-Derivat L-NAME analysiert. L-NAME wird von NO-Synthasen an Stelle von L-Arginin gebunden und kann dadurch kompetitiv die NO-Bildung verhindern (Moroz *et al.* 1998).

Um die Rolle der ERK1/2-MAPK-Kaskade zu untersuchen, wurde der Inhibitor PD-98059 eingesetzt. Er verhindert die Aktivierung von MEK durch vorgeschaltete Kinasen (MAPKKK) und inhibiert so die ERK1/2-MAPK-Kaskade (Alessi *et al.* 1995).

Zur Analyse der Rolle von Rac1 wurde in den vorliegenden Untersuchungen der Inhibitor NSC-23766 angewendet. Er bindet an eine Oberflächenvertiefung von Rac1, die für die Bindung der Rac1-GEFs entscheidend ist, und ist somit ein kompetitiver Inhibitor der Aktivierung von Rac1 (Gao *et al.* 2004).

2.2.5 Stimulationsexperimente

Um die Phosphorylierung einzelner Signalproteine untersuchen zu können, wurden HUVEC unter standardisierten Bedingungen mit S1P stimuliert und anschließend zur Western-Blot-Analyse aufgearbeitet. Dabei erfolgte die Aussaat der HUVEC drei Tage vor dem Experiment in 60-mm-Gewebekulturschalen (400 000/Schale) oder bei Transfektionsexperimenten vier Tage vor Stimulation in 30-mm-Gewebekulturschalen (180 000/Schale). Die Transfektion wurde am Tag nach der Aussaat durchgeführt. 5 h vor der Stimulation der Zellen wurde das Wachstumsmedium durch serumfreies Medium (M199 mit 0,25 % HSA) ersetzt. Nach 4,5 h wurden die Zellen zweimal mit Inkubationspuffer gewaschen und dann für 30 min bei 37 °C mit den entsprechenden Inhibitoren im Inkubationspuffer behandelt. Anschließend erfolgte die Stimulation mit S1P für die angegebenen Zeiten bei 37 °C. Die Reaktion wurde durch Waschen der Zellen mit eiskaltem Waschpuffer mit Phosphatase-Inhibitoren beendet. Es folgten die Zugabe von eiskaltem Lysepuffer und die Inkubation auf Eis für 15 min. Mittels Zellschaber wurden die Zellreste von der Gewebekulturschale abgelöst. Unlösliche Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation für 10 min bei 12 000 x g und 4 °C abgetrennt und der Überstand für die Proteinanalyse verwendet. Zur Herstellung von Proben für die elektrophoretische Auftrennung und Western Blot wurden die Lysate mit 0,5 Volumenteilen dreifach konzentriertem Laemmli-Puffer versetzt und bei 95 °C für 5 min erhitzt.

Inkubationspuffer (pH 7,4)	
145 mM	NaCl
10 mM	HEPES
10 mM	Glukose
5 mM	KCl
1,5 mM	CaCl ₂
1 mM	MgSO ₄
0,25 %	HSA

Waschpuffer	
50 mM	Tris, pH 7,4
50 mM	NaF
10 mM	Na ₄ P ₂ O ₇
2 mM	EDTA
1 mM	EGTA
1 mM	Na ₃ VO ₄
1 mM	DTT

Lysepuffer	
50 mM	Tris, pH 7,4
50 mM	NaF
10 mM	Na ₄ P ₂ O ₇
2 mM	EDTA
1 mM	EGTA
1 mM	Na ₃ VO ₄
1 mM	DTT
1 mM	PMSF
1 %	Triton X-100
0,1 %	SDS
10 µl/ml	PIC

3x Laemmli-Puffer	
186 mM	Tris, pH 6,8
10 mM	EDTA
15 %	Glycerin
9 %	SDS
6 %	ME
0,03 %	BPB

2.2.6 Proteinanalytische Methoden

2.2.6.1 Proteinkonzentrationsbestimmung

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurde der „DC™ Protein Assay“ von Bio-Rad nach den Angaben des Herstellers verwendet. Dabei wurden 5 bis 10 µl Zell-Lysat mit 200 µl deionisiertem Wasser verdünnt. Es erfolgte die Zugabe von 100 µl Reagenzmischung A' und 800 µl Reagenz B. 20 min später wurde die Absorption bei 750 nm Wellenlänge bestimmt. Die Berechnung der Proteinkonzentration erfolgte nach einer BSA-Eichkurve.

2.2.6.2 Immunpräzipitation der PI3Kβ

Die Expression der PI3Kβ-Isoform war im Western Blot nur schwach nachweisbar. Um das Signal zu verstärken, erfolgte eine Immunpräzipitation mit spezifischem anti-PI3Kβ-Antikörper und Protein A-Sepharose®. Letztere wurde vor Gebrauch über Nacht bei 4 °C in Zellwaschpuffer inkubiert, um zu quellen, und am folgenden Tag zweimal in Sepharosewaschpuffer gewaschen. Die Zellen wurden dreimal mit eiskaltem Zellwaschpuffer gewaschen und dann für 15 min mit Lysepuffer auf Eis inkubiert. Mittels Zellschaber und Pipette wurden Lysat und Zelltrümmer abgelöst und in 1,5-ml-Reaktionsgefäße überführt. Zellkerne und nicht-lysierte Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation für 6 min bei 700 x g und 4 °C abgetrennt und der Überstand weiterverwendet. Das Lysat wurde mit Protein A-Sepharose® versetzt und für 30 min bei 4 °C rotiert, um unspezifisch bindende Proteine aus dem Lysat zu entfernen (*preclearing*). Nach Abzentrifugation der Sepharose® (5 min, 20 000 x g, 4 °C) wurde die Proteinkonzentration im Überstand mittels „DC™ Protein Assay“ bestimmt. Lysat mit 400 bis 700 µg Proteingehalt wurde dann mit 4 µg p110β-Antikörper (sc-602) versetzt und über Nacht bei 4 °C rotiert. Die Lysat-Antikörper-Lösung wurde dann mit Protein A-Sepharose® versetzt und für 60 min bei 4 °C rotiert, um die Bindung der Antikörper an die Sepharose® zu ermöglichen. Die Sepharose® mit den gebundenen Antikörpern wurde anschließend dreimal mit Sepharosewaschpuffer für 5 min gewaschen und durch Zentrifugation (5 min, 20 000 x g, 4 °C) vom Überstand abgetrennt. Nach einem letzten Waschschrift in Zellwaschpuffer wurde das Sepharose®-Pellet mit Laemmli Puffer (siehe 2.2.5) versetzt und für 5 min bei 95 °C erhitzt, um die gebundenen Proteine abzulösen und für die SDS-PAGE aufzubereiten.

Zellwaschpuffer	
150 mM	NaCl
50 mM	Tris, pH 7,4
5 mM	MgCl ₂
1 mM	EGTA

Sepharosewaschpuffer	
150 mM	NaCl
50 mM	Tris, pH 7,4
10 mM	Na ₄ P ₂ O ₇
5 mM	MgCl ₂
1 mM	EGTA
1 mM	Na ₃ VO ₄
1 mM	DTT
1 %	NP40

Lysepuffer	
150 mM	NaCl
50 mM	Tris, pH 7,4
10 mM	Na ₄ P ₂ O ₇
5 mM	MgCl ₂
1 mM	EGTA
1 mM	Na ₃ VO ₄
1 mM	DTT
1 mM	PMSF
1 %	NP40
10 µl/ml	PIC

2.2.6.3 Rac-Aktivitäts-Assay

Der Nachweis von aktivem, GTP-gebundenem Rac erfolgte im sogenannten Pulldown-Assay. Dieser Assay nutzt die Fähigkeit von GTP-Rac, an die CRIB-Domäne der Kinase PAK1, einem Rac-Effektormolekül, zu binden. GTP-gebundenes Rac1 wird mit Hilfe eines Fusionsproteins aus CRIB-Domäne und Glutathion-S-Transferase (GST) über Glutathion-Sepharose™ 4B (GSH-Sepharose) aus Zell-Lysaten isoliert. Aufgereinigtes CRIB-GST-Fusionsprotein wurde freundlicherweise von Dr. Ignacio Rubio, Institut für Molekulare Zellbiologie der FSU Jena, zur Verfügung gestellt.

Die benötigte Menge GSH-Sepharose wurde dreimal mit eiskaltem Sepharosewaschpuffer gewaschen, um den in der Vorratslösung enthaltenen Ethanol zu entfernen. Anschließend wurde eine 50%ige Aufschlämmung mit Sepharosewaschpuffer hergestellt. Die Stimulation der Zellen wurde wie unter 2.2.5 beschrieben durchgeführt. Die Lyse der Zellen erfolgte in Anwesenheit des CRIB-GST-Fusionsproteins im Lysepuffer, um das nach Stimulation gebildete GTP-Rac zu binden, bevor eine Hydrolyse einsetzt. Vor der Lyse wurden die Zellen einmal mit eiskaltem Zellwaschpuffer gewaschen und dann wenige Sekunden mit kaltem Lysepuffer auf Eis inkubiert. Mittels Zellschaber und Pipette wurde das Lysat in 1,5-ml-Reaktionsgefäße überführt und für 10 Sekunden geschüttelt. Zellkerne und nicht-lysierte Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation für 5 min bei 20 000 x g und 4 °C abgetrennt und der Überstand weiterverwendet. Die Proteinkonzentration des Überstandes wurde bestimmt. Volumina mit einem Proteingehalt von 200 µg wurden mit GSH-Sepharose versetzt und für 30 min bei 4 °C rotiert, um die Bindung der GTP-Rac-CRIB-GST-Komplexe an die GSH-Sepharose zu ermöglichen. Die Sepharose mit den gebundenen Proteinkomplexen wurde anschließend durch Zentrifugation (1 min, 20 000 x g, 4 °C) pelletiert und zweimal mit Sepharosewaschpuffer gewaschen. Das Sepharose-Protein-Pellet wurde schließlich mit Laemmli Puffer (siehe 2.2.5) versetzt und für 5 min bei 95 °C erhitzt, um die gebundenen Proteine abzulösen und für die SDS-PAGE aufzubereiten. Restliches unbehandeltes Zell-Lysat wurde ebenfalls mit Laemmli Puffer versetzt und für 5 min bei 95 °C erhitzt. Abweichend vom Standard-SDS-PAGE-Protokoll (2.2.6.4) wurden Lysatproben (10 µg Proteingehalt) und GTP-Rac-Proben (vollständig) in einem 15%igen SDS-Polyacrylamidgel bei einer Elektrophoresezeit von 3 h aufgetrennt. Durch die Verwendung eines Rac1-spezifischen Antikörpers im Western Blot konnte speziell GTP-Rac1 in den aufgetrennten Proben nachgewiesen werden.

Zellwaschpuffer	
50 mM	NaCl
50 mM	Tris, pH 7,5
5 mM	MgCl ₂
1 mM	EGTA

Sepharosewaschpuffer	
50 mM	NaCl
50 mM	Tris, pH 7,5
5 mM	MgCl ₂
1 mM	EGTA
10 %	Glycerin
1 %	NP40

Lysepuffer	
50 mM	NaCl
50 mM	Tris, pH 7,5
5 mM	MgCl ₂
1 mM	EGTA
1 mM	PMSF
0,1 mM	GDP
10 %	Glycerin
1 %	NP40
10 µl/ml	PIC
20 µg/ml	CRIB-GST

2.2.6.4 SDS-PAGE (*Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*)

Die Auftrennung der Proteine der Lysate erfolgte mittels 7,5%iger oder 10%iger SDS-Polyacrylamidgele. Die Sammelgele waren jeweils 5%ig. Die Lysate wurden durch Zugabe von 0,5 Volumenteilen dreifach konzentriertem Laemmli-Puffer (siehe 2.2.5), Erhitzung bei 95 °C für 5 min und Abkühlung im Eis vorbereitet. Die aufgetragene Probemenge entsprach 30 bis 50 µg Gesamtprotein je Geltasche. Zur Abschätzung des Molekulargewichts wurde in einer zusätzlichen Geltasche ein Molekulargewichts-Größenstandard (*High-Range Rainbow™ Molecular Weight Markers*) aufgetragen. Die SDS-PAGE erfolgte in der vertikalen Elektrophoreseapparatur „PROTEAN® II xi Cell“ von Bio-Rad für 2 bis 2,5 h mit 4 °C-Wasserkühlung bei einer konstanten Stromstärke von 45 mA je Gel.

2.2.6.5 Elektro-Blot

Der Transfer der Proteine auf eine Immobilon-P-Transfer-Membran von Millipore wurde mittels der Apparatur „Trans-Blot® Electrophoretic Transfer Cell“ von Bio-Rad für 100 min mit 4 °C-Wasserkühlung bei 1,5 A in Transferpuffer (192 mM Glycin, 25 mM Tris, 10 % Methanol) durchgeführt. Nach dem Transfer wurden die Positionen der Banden des Molekulargewichts-Größenstandards auf der Membran markiert.

2.2.6.6 Immundetektion im Western Blot

Die Membran mit den gebundenen Proteinen wurde kurz in TN-Puffer (150 mM NaCl, 10 mM Tris, pH 7,6) gespült, anschließend für 60 min in Blockierungslösung (TN-Puffer mit 0,1 % Tween® 20 und 5 % Magermilchpulver) geschwenkt und dann zweimal mit Waschlösung (TN-Puffer mit 0,1 % Tween® 20) gespült. Die Inkubation mit dem primären Antikörper erfolgte unter kontinuierlichem Schwenken bei 4 °C über Nacht. Daraufhin wurde die Membran dreimal für je 15 min in Waschlösung gespült. Danach wurde ein peroxidasegekoppelter sekundärer Antikörper 1:2 000 bis 1:10 000 in Blockierungslösung verdünnt und für 45 min mit der Membran inkubiert. Durch dreimaliges Waschen mit Waschlösung für je 7 min wurden ungebundene Antikörper entfernt. Danach wurde die Membran für kurze Zeit bis zur Detektion der Proteine in TN-Puffer überführt. Die Detektion der Antigen-Antikörper-Komplexe erfolgte mit Hilfe des *ECL Western Blotting Detection Systems*. Dabei kommt es in den Bereichen mit peroxidasegekoppeltem sekundären Antikörper zu einer Oxidation von Luminol und Chemolumineszenz, die mittels Amersham Hyperfilm™ nachgewiesen wurde. Der entwickelte, fixierte und getrocknete Film wurde digitalisiert und mit der Software „ImageJ“ (Version 1.34n) densitometrisch analysiert.

Die Blots wurden zunächst mit Antikörpern gegen phosphorylierte Signalproteine angefärbt. Für Anfärbungen der entsprechenden nicht-phosphorylierten Proteine wurden die Antikörper der ersten Färbung von der Membran abgelöst. Dazu erfolgte eine Inkubation für 30 min bei 54 °C in einer Lösung mit 62,5 mM Tris (pH 6,7), 2 % SDS und 100 mM 2-Mercaptoethanol. Die Membran wurde vor der Wiederverwendung zweimal mit TN-Puffer gewaschen und danach wie oben beschrieben angefärbt.

2.2.7 cGMP-Bestimmung

HUVEC wurden über Nacht mit 10 μM Sepiapterin behandelt. Dann wurde das Wachstumsmedium durch Inkubationsmedium ersetzt. Nach 30 min Inkubation wurden die Zellen für 15 min mit Agonisten stimuliert. Die Reaktion wurde durch Absaugen des Mediums und Zugabe von 96%igem Ethanol gestoppt. Nach der Evaporation des Ethanols wurden die Zellen mit Radioimmunoassay(RIA)-Puffer (50 mM Tris, 4 mM EDTA, pH 7,5) versetzt. Der Zellaufschluß wurde durch schnelles Gefrieren in flüssigem Stickstoff und anschließendes Tauen unterstützt. Nach Zentrifugation der Zellextrakte wurde der Überstand zur radioimmunologischen cGMP-Messung eingesetzt. Der cGMP-Gehalt wurde mittels „cGMP – [^3H] Biotrak Assay“ nach Angaben des Herstellers bestimmt. In Parallelansätzen wurden die Zellen lysiert (100 mM NaOH, 2 % Na_2CO_3 , 1 % SDS) und der Proteingehalt unter Verwendung des „DC™ Protein Assay“ von Bio-Rad bestimmt. Die Menge des gebildeten cGMP wurde in pmol cGMP pro mg Zellprotein angegeben.

Inkubationsmedium
M199 mit:
1 mM L-Arginin
0,5 mM Isobutylmethylxanthin
10 μM Sepiapterin
200 U/ml Superoxid-Dismutase

Lysepuffer
100 mM NaOH
2 % Na_2CO_3
1 % SDS

2.2.8 Migrationsassay

Zur Untersuchung der Migration der Endothelzellen in Richtung eines S1P-Konzentrationsgradienten wurde ein Zwei-Kammer-Transwell-System angewandt. Die untere Kammer ist dabei das Well einer 12-Well-Gewebekulturplatte, während die obere Kammer aus einem dazu passenden Zellkultur-Insert besteht. Die Zellkulturmedien beider Kammern sind über Poren (8 μm Durchmesser) in der Bodenmembran des Zellkultur-Inserts verbunden. Das in die untere Kammer gegebene S1P diffundiert durch die Poren in die obere Kammer. Dadurch besteht bis zum Ausgleich des Konzentrationsunterschiedes für mehrere Stunden ein S1P-Gradient, der die auf der Membranoberseite ausgesäten Zellen dazu anregt, durch die Poren auf die Membranunterseite zu wandern.

Am Tag des Experiments wurden die Zellkultur-Inserts (BD Falcon™ *Cell Culture Inserts*, 8 μm Porengröße) mit Gelatine beschichtet und in Wells einer 12-Well-Gewebekulturplatte eingesetzt (BD Falcon™ *Cell Culture Insert Companion Plates*). Die Wells enthielten 1 ml serumfreies Medium (M199 mit 0,25 % HSA) und in die Inserts wurden $2,5 \times 10^5$ Zellen in 0,5 ml serumfreiem Medium ausgesät. Inhibitoren wurden in obere und untere Kammern gegeben und 30 min lang mit den Zellen vorinkubiert. Danach erfolgte die Zugabe von 1 μM S1P in die unteren Kammer. 4 h nach S1P-Zugabe wurde der Migrationsprozeß durch Absaugen des Mediums und 10minütige Fixierung der Zellen mit 4%iger Paraformaldehydlösung gestoppt. Nach dem Waschen der Membranen mit Wasser erfolgte die Färbung der Zellen mit Hämatoxylin für 5 min. Überschüssige Färbelösung wurde mit Wasser abgewaschen. Zur Farbentwicklung wurden die Membranen schließlich für 10 min in Wasser inkubiert. Die nichtmigrierten Zellen auf der Oberseite der Membran wurden mit einem Wattestäbchen entfernt. Über Nacht

erfolgte die Trocknung der Membranen, die dann mit einem Skalpell vom Zellkultur-Insert abgetrennt und mit ENTELLAN® auf Objektträgern eingebettet wurden. Die Zählung der migrierten Zellen erfolgte mikroskopisch bei 100facher Vergrößerung. Je Membran wurden zehn zufällig gewählte Gesichtsfelder ausgezählt und gemittelt.

2.2.9 Bestimmung der Signalintensitäten und statistische Analyse

Die Signalintensitäten der einzelnen Protein- und DNA-Banden wurden durch Densitometrie mit Hilfe der Bildanalysesoftware „ImageJ“ (Version 1.34n) bestimmt. Gemessen wurden dabei der durchschnittliche Grauwert der jeweiligen Bande und der Grauwert des Hintergrundes. Die Differenz zwischen diesen beiden Werten ergab die Signalintensität. Die potentiell variable Signalintensität von phosphorylierten Proteinen und RNAi-Zielpoteinen wurde normalisiert, indem sie in Relation zur Signalintensität der entsprechenden Gegenfärbung beziehungsweise von β -Aktin oder Akt gesetzt wurde. Alle Daten, mit Ausnahme der Ergebnisse des siRNA-Screenings und der Optimierung der siRNA-Transfektion, werden als Mittelwert von drei bis fünf Experimenten mit zugehörigem Standardfehler des Mittelwertes (SEM) angegeben. Zur Berechnung der statistischen Signifikanz der Ergebnisse wurden Student-t-Tests und Multivarianzanalysen (ANOVA) mit Korrektur nach Bonferroni durchgeführt. Dabei wurden bei Experimenten mit S1P jeweils die S1P-induzierten Veränderungen (stimulierte Werte minus Kontrollwerte) verglichen. Ein statistisch signifikanter Unterschied wurde angenommen, wenn der entsprechende p-Wert kleiner als 0,05 war.

3 Ergebnisse

3.1 Etablierung der RNA-Interferenz-Methode

Voraussetzungen für die Charakterisierung von PI3K-Isoformen im S1P-Signaling war neben selektiven pharmakologischen Inhibitoren die Methode der RNA-Interferenz, mit deren Hilfe die Expression der einzelnen Proteine vermindert werden konnte. Für Primärzellen wie HUVEC war dabei die Transfektion mit siRNA die Methode der Wahl.

3.1.1 p110 γ -siRNA-Screening

Da es keine veröffentlichten Sequenzen und auch keine kommerziell erhältliche, validierte siRNA für die katalytische Untereinheit der PI3K γ gab, wurde zuerst nach einer geeigneten siRNA-Sequenz gesucht. Zunächst wurde die online verfügbare Suchmaschine „*siRNA at Whitehead*“ (<http://jura.wi.mit.edu/bioc/siRNAext/>) des „*Whitehead Institute for Biomedical Research*“ (Cambridge, USA) verwendet, die sich zu der Zeit (2003) an den Arbeiten von Sayda M. Elbashir orientierte (Elbashir *et al.* 2001a; Elbashir *et al.* 2001b). Die Suchmuster „AAN19TT“ und „NAN17YNN“ ergaben zusammen mit dem Guanin/Cytosin-Gehalt „45-55 %“ vier Treffer innerhalb der kodierenden Sequenz der p110 γ . Deren Knockdown-Effizienz wurde nach Transfektion mit der Calciumphosphatmethode in HEK293::p110 γ -Zellen verglichen (Abbildung 4). Die am stärksten wirksame siRNA #2 führte drei Tage nach der Transfektion zu einer Reduktion der p110 γ -Expression um 46 %. Um eine siRNA mit stärkerer Wirkung zu erhalten, wurde eine weitere Suchmaschine verwendet. Das „Dharmacon siDESIGN® Center“ (<http://www.dharmacon.com/DesignCenter/DesignCenterPage.aspx>) der Dharmacon, Inc. (Chicago, USA) verwendete zur Trefferauswertung ein Punktesystem anhand der Arbeit von Reynolds und Mitarbeitern (Reynolds *et al.* 2004). Die Positionsangaben beziehen sich dabei auf den Passagierstrang. Jeweils einen Pluspunkt gab es für G/C-Gehalt zwischen 30 und 52 Prozent, das Nichtvorhandensein von „*internal repeats*“ und die Positionen 19=Adenin (A), 3=A und 10=Urazil (U). Drei bis fünf Pluspunkte gab es für drei- bis fünfmal A/U in Position 15-19. Jeweils einen Minuspunkt gab es für G/C an Position 19 und G an Position 13. Anschließend wurden automatisch solche Sequenzen, die bei einer BLASTn-Suche (*Word size=7, Expect=500*) einen signifikanten „*alignment score*“ gleich 16 oder größer haben, aussortiert. Die Suche ergab einen Treffer mit der maximal erreichbaren Punktzahl Zehn in der 3'-nichttranslatierten Region und drei Treffer mit neun Punkten innerhalb der kodierenden Sequenz der p110 γ . Einer der drei Neun-Punkte-Treffer hatte Pos. 1=G, die anderen beiden Pos. 1=U. Die Sequenz mit Pos. 1=G wurde ausgewählt, weil sie den größten Unterschied in der thermodynamischen Stabilität der beiden siRNA-Enden hat (Parker & Barford 2006). Die zugehörige siRNA wird im weiteren Text als „D3g“ bezeichnet. Sie bewirkte in einer Konzentration von 4 $\mu\text{g}/10^6$ Zellen nach Transfektion mittels Elektroporation in HUVEC eine etwa doppelt so starke Reduktion der p110 γ -Expression wie die siRNA #2 (Daten nicht dargestellt). Die in den anfänglichen Experimenten eingesetzte Konzentration ist allerdings als recht hoch einzuschätzen und bringt das Risiko von Nebenwirkungen mit sich.

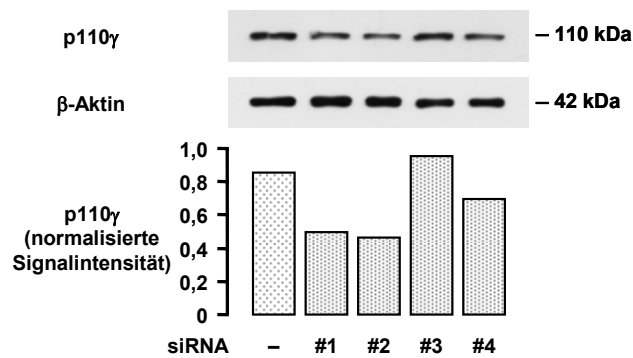


Abbildung 4: p110γ-siRNA-Screening

HEK293::p110γ-Zellen wurden in eine 24-Well-Gewebekulturplatte ausgesät und 24 h später mit den siRNA #1 – #4 transfiziert (Calciumphosphatmethode; 0,75 µg siRNA/Well). 72 h später erfolgte die Zell-Lyse. Zur Western-Blot-Analyse wurden Probenmengen mit 5 µg Gesamtprotein-gehalt verwendet. Die Detektion der Proteinbanden erfolgte mit spezifischen Antikörpern gegen PI3Kγ bzw. β-Aktin. Das Diagramm zeigt die densitometrische Auswertung der Immunoblots. Die Normalisierung der p110γ-Densitometriewerte erfolgte gegen die entsprechenden β-Aktin-Werte.

3.1.2 Optimierung der siRNA-Transfektion in HUVEC

Da die Elektroporation unter unseren Bedingungen hohe siRNA-Zusätze benötigte, keine gut reproduzierbaren Ergebnisse lieferte und dabei zudem hohe Zellverluste auftraten, wurde sie mit zwei Methoden verglichen, die laut Hersteller ebenfalls für die Transfektion von HUVEC geeignet sind: RNAiFECT und SAINT-MIX. Im Direktvergleich führte die Lipofektion mit dem kationischen, amphiphilen Reagenz „SAINT-MIX“ bei Einsatz von 1 oder 2 µg „D3g“ siRNA zum besten Ergebnis (Abbildung 5). Dieses Reagenz wurde daher zunächst für die weiteren Experimente verwendet. Der Hersteller von „SAINT-MIX“ brachte später das speziell für die siRNA-Transfektion entwickelte Transfektionsreagenz „SAINT-RED“ (*Synthetic, Amphiphilic, Interactive – RNAi-Enhanced Delivery*) heraus, welches aus den gleichen Komponenten wie SAINT-MIX besteht, sich aber im Mischungsverhältnis der beiden unterscheidet. SAINT-RED wurde dann von uns für die weiteren RNAi-Experimente eingesetzt (ab Abbildung 7).

Zunächst wurden Experimente zur Testung von Zeit- und Konzentrationsabhängigkeit der p110γ-siRNA „D3g“ durchgeführt. Abbildung 6 zeigt, daß 0,5 µg/30-mm-Well dieser siRNA die Expression des Zielproteins nach 72 h nur um 58 % reduzierte, während bei 1 µg eine Downregulation von 79 % beobachtet wurde. Letztere Konzentration wurde daher für die weiteren Versuche verwendet. Um festzustellen, zu welchem Zeitpunkt nach Transfektion mit einer maximalen Downregulation zu rechnen ist, wurde die Zeitabhängigkeit des siRNA-Effektes getestet. Generell ist der zeitliche Verlauf der Downregulation des Zielproteins vom Zelltyp, von der Halbwertszeit des Proteins und von dessen Ausgangsmenge abhängig (Arenz & Schepers 2003). In schnell wachsenden Zellen (z. B. HeLa) wird der maximale Protein-Knockdown-Effekt durch siRNA gewöhnlich nach 72 h erreicht (Dykxhoorn *et al.* 2003). Fünf bis sieben Tage nach der Transfektion erreicht die Proteinkonzentration meist wieder den Ausgangswert (Caplen 2003). Das Expressionsniveau von p110γ wurde daher am dritten, vierten und fünften Tag nach der Transfektion der Zellen mit p110γ-siRNA „D3g“ untersucht (Empfehlung von Ambion, Byrom 2004). Unter unseren Bedingungen ist die p110γ-Expression bereits nach drei Tagen am niedrigsten und nimmt nach vier Tagen wieder leicht zu (Abbildung 7).

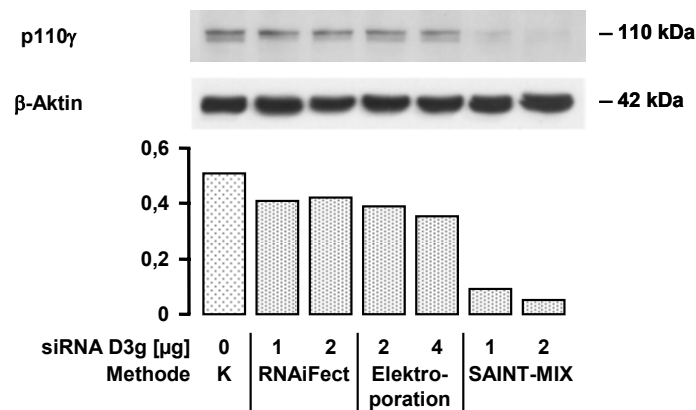


Abbildung 5: Vergleich verschiedener Transfektionsmethoden

HUVEC wurden in 6-Well-Gewebekulturplatten ausgesät und 24 h später mit 1 oder 2 μ g siRNA „D3g“ je Well transfiziert (RNAiFECT und SAINT-MIX-Methode). Kontrollzellen (K) blieben unbehandelt. Aus dem gleichen Zell-Pool wurden je 1×10^6 HUVEC für die Elektroporation mit 2 oder 4 μ g siRNA „D3g“ verwendet und anschließend in 60-mm-Gewebekulturschalen überführt. Nach 72 h Inkubation wurden die Zellen lysiert. Die Proben für die Western-Blot-Analyse enthielten 30 μ g Gesamtprotein. Zur Detektion der Proteinbanden wurden spezifische Antikörper gegen PI3K γ bzw. β -Aktin verwendet. Das Diagramm zeigt die densitometrische Auswertung des Immunoblots. Die Normalisierung der p110 γ -Densitometriewerte erfolgte gegen die entsprechenden β -Aktin-Werte.

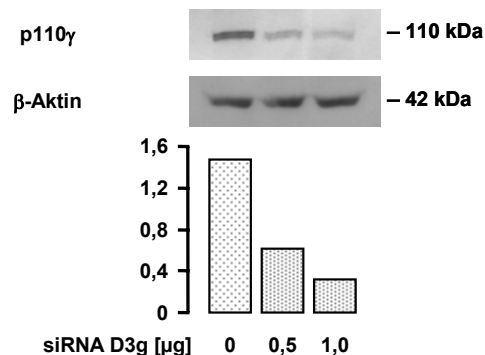


Abbildung 6: Vergleich verschiedener siRNA-Mengen

Die Aussaat der HUVEC erfolgte in einer 6-Well-Gewebekulturplatte. 24 h danach wurden die Zellen mittels SAINT-MIX transfiziert. Dafür wurden 0,5 und 1 μ g siRNA „D3g“ je Well verwendet. Die Zellen wurden nach einer 72-stündigen Inkubation lysiert. Die Proben für die Western-Blot-Analyse enthielten 50 μ g Gesamtprotein. Zur Detektion der Proteinbanden wurden spezifische Antikörper gegen PI3K γ bzw. β -Aktin verwendet. Das Diagramm zeigt die densitometrische Auswertung des Immunoblots. Die Normalisierung der p110 γ -Densitometriewerte erfolgte gegen die entsprechenden β -Aktin-Werte.

In allen RNAi-Experimenten wurde zusätzlich zur spezifischen siRNA eine Kontroll-siRNA mitgeführt, um unspezifische Effekte der Transfektion zu erfassen. In den ersten Jahren nach der Entdeckung von RNAi wurden so genannte *scrambled control siRNAs* als Kontroll-siRNA verwendet. Die Anordnung der Nukleotide der siRNA wurde dafür so verändert, daß die resultierende siRNA möglichst keine passende Zielsequenz im Genom findet. Dabei bestand jedoch ein erhöhtes Risiko, teilweise komplementäre Sequenzen zu binden und deren Translation zu behindern. Daher ging man später dazu über, Kontroll-siRNA unabhängig von der Sequenz der siRNA zu entwickeln und sie ausgiebig mittels DNA-Microarrays zu testen. Eine solche validierte Kontroll-siRNA von QIAGEN wurde auch in unseren RNAi-Experimenten als Negativkontrolle ausgewählt. Sie führte wie erwartet nicht zu einer Beeinflussung der Expression der p110 γ , während die spezifische p110 γ -siRNA „D3g“ nach drei Tagen eine mittlere Verringerung der p110 γ -Proteinmenge um 89 % bewirkte (Abbildung 7, Abbildung 8).

3.1.3 p110 β -siRNA

Im Unterschied zu p110 γ gab es für p110 β eine kommerziell erhältliche, validierte siRNA von QIAGEN. Die Detektion von p110 β im Western Blot und damit die Überprüfung des Effektes der p110 β -siRNA stellte sich jedoch als schwierig heraus. Unterschiedliche kommerziell erhältliche Antikörper waren gänzlich ungeeignet, PI3K β im Immunoblot zuverlässig nachzuweisen (Daten nicht gezeigt). Der einzige Antikörper (sc-602), mit dem eine Detektion möglich war, zeigte eine Doppelbande im Bereich von 110 kDa. Dabei verschwand nur die obere der beiden Banden durch die Verwendung der validierten p110 β -siRNA. Wir vermuten daher, daß die untere stärker ausgeprägte Bande als unspezifisch zu betrachten ist (Abbildung 9). Eine densitometrische Quantifizierung der oberen Bande war wegen der geringen Trennschärfe kaum möglich. Daher wurde die Wirkung der p110 β -siRNA mit anderen Methoden (RT-PCR, Immunpräzipitation) überprüft.

Abbildung 10 zeigt die Ergebnisse der semiquantitativen RT-PCR. Die p110 β -mRNA-Menge wurde nach Behandlung von HUVEC mit spezifischer siRNA um 83 % reduziert.

In Abbildung 11 sind Experimente zur Immunpräzipitation (IP) von p85 und p110 β dargestellt. Die katalytische Untereinheit p110 β (neben p110 α und p110 δ) konnte nicht nur direkt, sondern auch durch IP der regulatorischen Untereinheit p85 aus dem Zell-Lysat isoliert werden, da beide Untereinheiten obligatorisch als Heterodimere vorliegen (Geering *et al.* 2007). Die densitometrische Auswertung der p85-IP zeigt eine Verringerung der p110 β -Expression durch p110 β -siRNA (6 μ g/90-mm-Schale, 3 Tage) um ca. 93 % (Abbildung 11A). Zur direkten IP von p110 β wurde der gleiche Antikörper wie in den Western-Blot-Experimenten eingesetzt. Interessanterweise war nach der IP von p110 β aber nur eine Bande an Stelle der im Western Blot beobachteten Doppelbande zu sehen (Abbildung 11B). Offensichtlich bindet der verwendete p110 β -Antikörper das unspezifische Protein nicht im nativen Zustand (IP), sondern nur im denaturierten Zustand (Western Blot der Zell-Lysate). Abbildung 11B zeigt, daß eine Inkubation von HUVEC mit spezifischer p110 β -siRNA (6 μ g/90-mm-Schale, 3 Tage) die Expression von p110 β um 70 % reduziert.

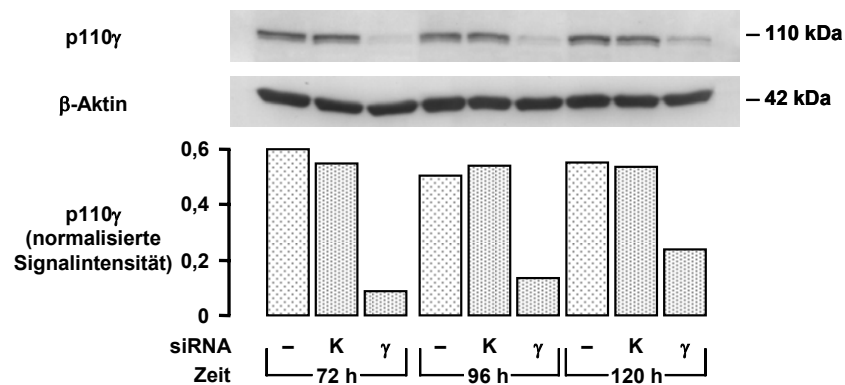


Abbildung 7: Einfluß der Inkubationszeit nach Transfektion

Die Transfektion der HUVEC durch SAINT-RED erfolgte 24 h nach ihrer Aussaat in drei 6-Well-Gewebekulturplatten mit 1 µg Kontroll-siRNA (K) oder siRNA „D3g“ (γ) je Well. Zellen wurden nach 72, 96 und 120 h lysiert. Proben für die Western-Blot-Analyse enthielten 40 µg Gesamtprotein. Zur Detektion der Proteinbanden wurden spezifische Antikörper gegen PI3Kγ bzw. β-Aktin verwendet. Das Diagramm zeigt die densitometrische Auswertung des Immunoblots. Die Normalisierung der p110γ-Densitometriewerte erfolgte gegen die entsprechenden β-Aktin-Werte.

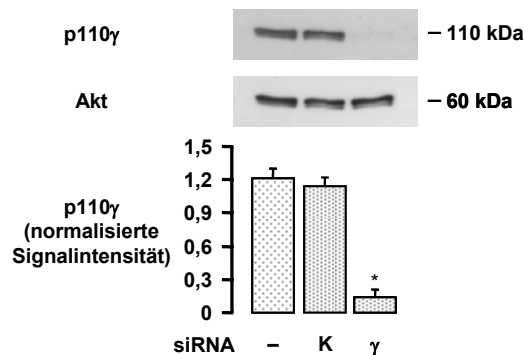


Abbildung 8: Kontroll-siRNA und p110γ-siRNA „D3g“

HUVEC wurden in 30-mm-Gewebekulturschalen ausgesät und 24 h später mit 1 µg/Schale Kontroll-siRNA (K) oder 1 µg siRNA „D3g“ (γ) mit Hilfe von SAINT-RED transfiziert. Die Zell-Lyse erfolgte nach weiteren 72 h Inkubation. Zur Western-Blot-Analyse wurden Proben mit je 40 µg Gesamtproteingehalt verwendet. Spezifische Antikörper gegen PI3Kγ bzw. Akt wurden für die Immundetektion verwendet. Die Normalisierung der p110γ-Densitometriewerte erfolgte gegen die entsprechenden Akt-Werte. Die gezeigten Filmausschnitte sind repräsentativ für drei unabhängige Experimente. Das Diagramm zeigt die densitometrische Auswertung der Immunoblots (Mittelwerte ± SEM, n=3, *p<0,05).

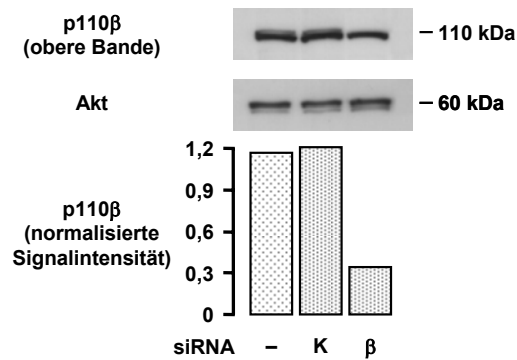


Abbildung 9: Knockdown von p110β – Detektion im Western Blot

HUVEC wurden in 30-mm-Gewebekulturschalen ausgesät und 24 h später mit 1 µg Kontroll-siRNA (K) oder 1 µg p110β-siRNA (β) je Schale mit Hilfe von SAINT-RED transfiziert. Die Zell-Lyse erfolgte nach weiteren 72 h Inkubation. Zur Western-Blot-Analyse wurden Proben mit je 40 µg Gesamtproteingehalt verwendet. Spezifische Antikörper gegen PI3Kβ bzw. Akt wurden für die Immundetektion verwendet. Das Diagramm zeigt die densitometrische Auswertung des Immunoblots. Die Normalisierung der p110β-Densitometriewerte erfolgte gegen die entsprechenden Akt-Werte.

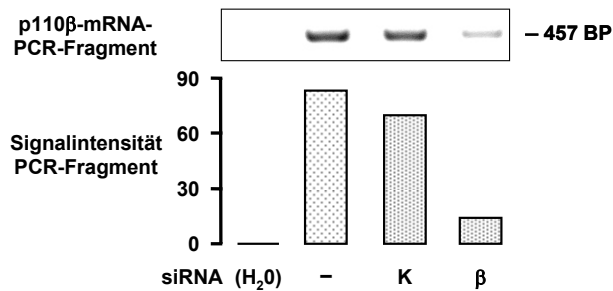


Abbildung 10: Knockdown von p110β – Detektion durch RT-PCR

HUVEC wurden in 60-mm-Gewebekulturschalen ausgesät und 24 h später mit 2,5 µg Kontroll-siRNA (K) oder 2,5 µg p110β-siRNA (β) je Schale mit Hilfe von SAINT-RED transfiziert. Nach 72 h Inkubation erfolgte die Isolation der Gesamt-RNA. Für die RT-PCR wurden Proben mit je 1 µg RNA verwendet. Für die RT-PCR-Kontaminationskontrolle (H₂O) wurde RNase-freies Wasser an Stelle von RNA in den Reaktionsansatz gegeben. Auf die 30minütige reverse Transkription folgten 30 PCR-Zyklen. Nach Beendigung der Reaktion wurde 1/4 des jeweiligen Reaktionsansatzes elektrophoretisch im 1%igen Agarosegel getrennt. Zur besseren Darstellung wurde das Digitalfoto invertiert.

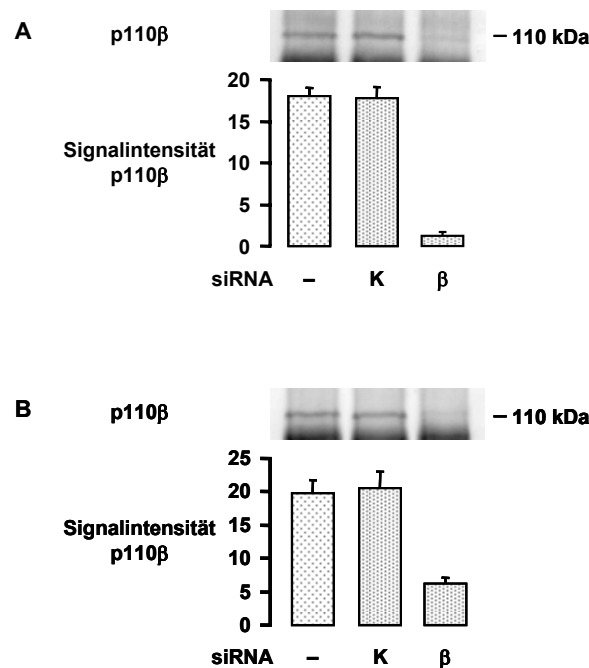


Abbildung 11: Knockdown von p110β – Quantifizierung nach Immunpräzipitation

HUVEC wurden in 90-mm-Gewebekulturschalen ausgesät und 24 h später mit 6 µg Kontroll-siRNA (K) oder 6 µg p110β-siRNA (β) je Schale mit Hilfe von SAINT-RED transfiziert. 72 h später wurden die Zellen lysiert. Für die Immunpräzipitation mit p85-Antikörpern (**A**) oder PI3Kβ-Antikörpern (**B**) wurden Proben mit je 700 µg Gesamtproteingehalt verwendet. Die Western-Blot-Analyse erfolgte mit dem jeweiligen gesamten Immunpräzipitat. Spezifische Antikörper gegen PI3Kβ wurden für die Immundetektion verwendet. Die gezeigten Filmausschnitte ist repräsentativ für je zwei unabhängige Experimente und das Diagramm zeigt die densitometrische Auswertung der Blots (Mittelwerte ± SEM, n=2).

3.2 S1P-induzierte Phosphorylierung von Akt in HUVEC

Durch Stimulation von HUVEC mit S1P kommt es zur Phosphorylierung von Akt (Thr308/Ser473). Diese Phosphorylierung ist PI3K-abhängig, die verantwortlichen PI3K-Isoformen sind jedoch nicht bekannt und sollen hier charakterisiert werden. Die Akt-Phosphorylierung wurde dabei mit Antikörpern gegen am Serinrest 473 phosphorylierte Akt detektiert.

3.2.1 Zeitlicher Verlauf

Um Änderungen der S1P-induzierten Akt-Phosphorylierung nach Einfluß verschiedener Faktoren gut beurteilen zu können, sollten die Untersuchungen unter Bedingungen durchgeführt werden, unter denen eine maximale Akt-Phosphorylierung auftritt. Deshalb wurde zunächst der zeitliche Verlauf der Phosphorylierung untersucht. Abbildung 12 zeigt, daß das Signal 2 min nach Zugabe von S1P am stärksten ausgeprägt war. Diese Inkubationszeit wurde daher für alle weiteren Experimente verwendet.

3.2.2 Wirkung von Tyrosinkinase-Inhibitoren

In HUVEC wurde nach Stimulation mit S1P eine Transaktivierung des VEGF-Rezeptors, in anderen Zellen eine Transaktivierung des EGF-Rezeptors beschrieben (Kim *et al.* 2000; Endo *et al.* 2002). Da die Aktivierung dieser Rezeptortyrosinkinasen möglicherweise zur S1P-induzierten Akt-Phosphorylierung beiträgt, wurde ihre Rolle durch Einsatz spezifischer Inhibitoren untersucht. Zur Anwendung kamen ein Inhibitor des EGF-Rezeptors (AG1478), ein Hemmstoff des VEGF-Rezeptors 2 (SU5614) sowie ein genereller Tyrosinkinase-Hemmer (Genistein). Dabei stellte sich heraus, daß weder die Rezeptortyrosinkinase für VEGF (VEGFR2) noch die für EGF die S1P-induzierte Akt-Phosphorylierung vermittelt (Abbildung 13). Darüber hinaus hatte auch Genistein keinen Effekt, was vermuten läßt, daß Tyrosinkinasen in diesem Zusammenhang kaum von Bedeutung sind (Abbildung 13).

3.2.3 Wirkung verschiedener PI3K-Inhibitoren

Zur Untersuchung der Rolle von PI3K-Isoformen in der S1P-induzierten Akt-Phosphorylierung kamen verschiedene Inhibitoren zum Einsatz. Unsere Daten bestätigten zunächst, daß Wortmannin, ein genereller PI3K-Inhibitor, die S1P-induzierte Akt-Aktivierung hemmt (Abbildung 14). Weiterhin konnten wir zeigen, daß der Signalweg von S1P zu Akt durch Pertussistoxin, einen Inhibitor heterotrimerer G_i -Proteine, vollständig blockiert wird (Abbildung 14) und daher vermutlich G_i -Protein-sensitive PI3Ks beteiligt sind.

Da sowohl $p110\gamma$ als auch $p110\beta$ direkt durch $\beta\gamma$ -Untereinheiten von G_i -Proteinen aktiviert werden können (Maier *et al.* 1999; Murga *et al.* 2000; Brock *et al.* 2003), stellen sie Kandidaten für die Vermittlung der S1P-induzierten Akt-Phosphorylierung dar. Daher wurde der Effekt Isoform-spezifischer Inhibitoren für PI3K β (TGX-221) und PI3K γ (AS-252424) untersucht. Abbildung 14 zeigt, daß TGX-221 eine deutliche Hemmung der Akt-Phosphorylierung nach S1P bewirkt. Diese Hemmung verlief konzentrationsabhängig (Abbildung 15). Im Gegensatz zu Pertussistoxin, Wortmannin oder TGX-221 führt der PI3K γ -Inhibitor AS-252424 bei einer Konzentration von 1 μ M zu keiner Veränderung des Signals (Abbildung 14). Auch eine noch höhere Konzentration (10 μ M) war ohne Wirkung (nicht dargestellt). TGX-221 wirkte dagegen genauso stark wie Wortmannin. Interessanterweise erfolgt somit der Signalweg zur Phosphorylierung von Akt nach Stimulierung von HUVEC mit S1P nicht über PI3K γ sondern PI3K β (Abbildung 14).

Als nächstes erfolgte die Untersuchung des zeitlichen Verlaufs der S1P-stimulierten Akt-Phosphorylierung in An- oder Abwesenheit von TGX-221. In diesen und weiteren Versuchen wurde eine TGX-221-Konzentration von 0,1 μ M verwendet (90 % Hemmung), um unspezifische Effekte zu minimieren. Die Inhibition der S1P-induzierten Akt-Phosphorylierung durch 0,1 μ M TGX-221 war während des gesamten Stimulationszeitraumes von 0,25 bis 10 Minuten vergleichbar (Abbildung 16).

Eine Funktion der über Rezeptortyrosinkinasen stimulierten PI3K-Isoformen PI3K α und PI3K δ in der S1P-induzierten Stimulierung von Akt war unwahrscheinlich, da, wie bereits gezeigt, Genistein, ein genereller Tyrosinkinase-Inhibitor, keinen Einfluß hatte (Abbildung 13). Dementsprechend zeigte der Einsatz des PI3K δ -Inhibitors IC87114 keine Hemmung der Akt-Phosphorylierung nach S1P (Abbildung 17). Ein Hemmstoff der PI3K α stand zum Zeitpunkt der Untersuchungen nicht zur Verfügung.

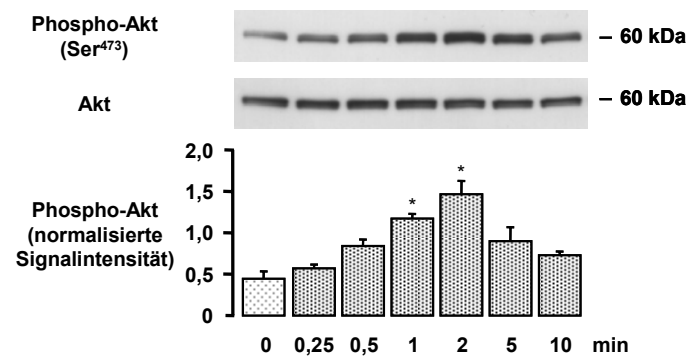


Abbildung 12: Zeitlicher Verlauf der S1P-induzierten Akt-Phosphorylierung

HUVEC wurden in 60-mm-Gewebekulturschalen ausgesät und drei Tage später für 5 h in wachstumsfaktorfreiem Medium inkubiert. Dann erfolgte die Zugabe von 1 μ M S1P für 15 s bis 10 min mit anschließender Zell-Lyse. Zur Western-Blot-Analyse wurden Proben mit je 50 μ g Gesamtproteingehalt verwendet. Für die Immundetektion wurden zunächst spezifische Phospho-Akt-Antikörper (Ser473) verwendet und anschließend Gesamt-Akt-Antikörper für die Gegenfärbung. Die Normalisierung der Phospho-Akt-Densitometriewerte erfolgte gegen die entsprechenden Akt-Werte. Die gezeigten Filmausschnitte sind repräsentativ für drei unabhängige Experimente. Das Diagramm zeigt die Daten der densitometrischen Auswertung (Mittelwerte \pm SEM, $n=3$, * $p<0,05$)

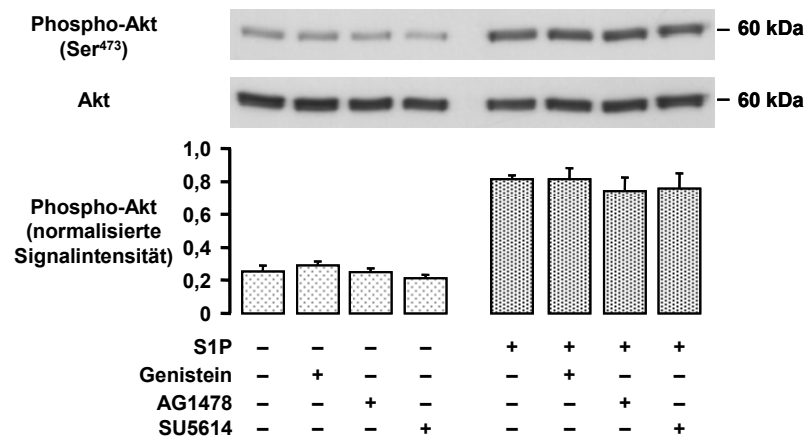


Abbildung 13: Wirkung von Tyrosinkinase-Inhibitoren auf die S1P-induzierte Akt-Phosphorylierung in HUVEC

HUVEC wurden in 60-mm-Gewebekulturschalen ausgesät und vier Tage später für 5 h in wachstumsfaktorfreiem Medium inkubiert. Es folgten eine 30minütige Inkubation mit Tyrosinkinase-Inhibitoren (10 μ M Genistein, 1 μ M AG1478, 10 μ M SU5614), anschließend die Zugabe von 1 μ M S1P für 2 min sowie die Lyse der Zellen. Zur Western-Blot-Analyse wurden Proben mit je 50 μ g Gesamtproteingehalt verwendet. Für die Immundetektion wurden zunächst spezifische Phospho-Akt-Antikörper (Ser473) verwendet und anschließend Gesamt-Akt-Antikörper für die Gegenfärbung. Die Normalisierung der Phospho-Akt-Densitometriewerte erfolgte gegen die entsprechenden Akt-Werte. Die gezeigten Filmausschnitte sind repräsentativ für drei unabhängige Experimente. Das Diagramm zeigt die Daten der densitometrischen Auswertung (Mittelwerte \pm SEM, $n=3$)

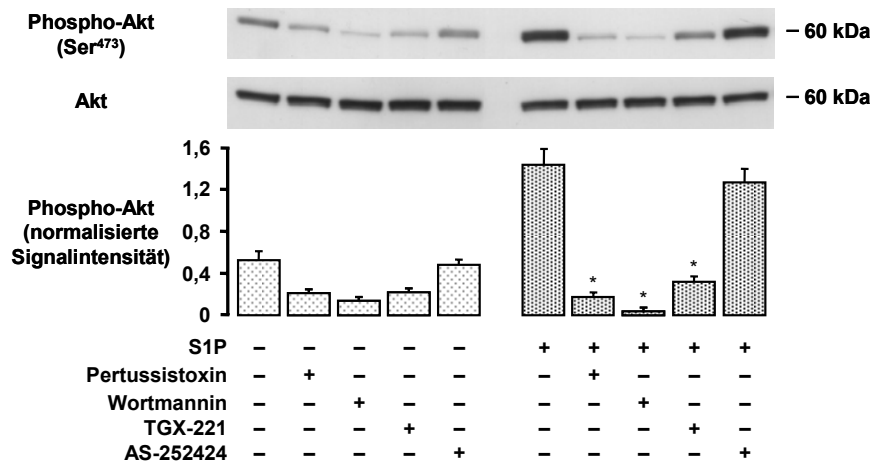


Abbildung 14: Wirkung von Pertussis toxin und PI3K-Inhibitoren auf die S1P-induzierte Akt-Phosphorylierung in HUVEC

HUVEC wurden in 60-mm-Gewebekulturschalen ausgesät und drei Tage später für 5 h in wachstumsfaktorfreiem Medium inkubiert. Pertussis toxin (500 ng/ml) wurde bereits 3 h vor Ablauf dieser Inkubationszeit zugesetzt. In parallelen Schalen erfolgte eine 30minütige Vorinkubation mit PI3K-Inhibitoren (0,1 μ M Wortmannin, 0,1 μ M TGX-221, 1 μ M AS-252424), anschließend die Zugabe von 1 μ M S1P für 2 min und dann die Lyse der Zellen. Zur Western-Blot-Analyse wurden Proben mit je 50 μ g Gesamtproteingehalt verwendet. Für die Immundetektion wurden zunächst spezifische Phospho-Akt-Antikörper (Ser473) verwendet und anschließend Gesamt-Akt-Antikörper für die Gegenfärbung. Die Normalisierung der Phospho-Akt-Densitometriewerte erfolgte gegen die entsprechenden Akt-Werte. Die gezeigten Filmausschnitte sind repräsentativ für vier unabhängige Experimente. Das Diagramm zeigt die zugehörige densitometrische Analyse (Mittelwerte \pm SEM, $n=4$, $*p<0,05$)

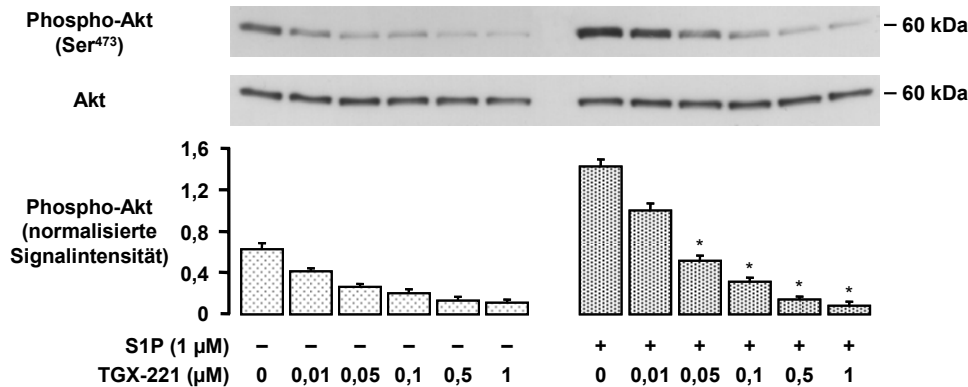


Abbildung 15: Wirkung von TGX-221 auf die S1P-induzierte Akt-Phosphorylierung in HUVEC

HUVEC wurden in 60-mm-Gewebekulturschalen ausgesät und drei Tage später für 5 h in wachstumsfaktorfreiem Medium inkubiert. Es folgten eine 30minütige Inkubation mit TGX-221 (0,01 bis 1 μ M), anschließend die Zugabe von 1 μ M S1P für 2 min und dann die Lyse der Zellen. Zur Western-Blot-Analyse wurden Proben mit je 50 μ g Gesamtproteingehalt verwendet. Für die Immundetektion wurden zunächst spezifische Phospho-Akt-Antikörper (Ser473) verwendet und anschließend Gesamt-Akt-Antikörper für die Gegenfärbung. Die Normalisierung der Phospho-Akt-Densitometriewerte erfolgte gegen die entsprechenden Akt-Werte. Die gezeigten Filmausschnitte sind repräsentativ für vier unabhängige Experimente und das Diagramm zeigt die entsprechende densitometrische Auswertung (Mittelwerte \pm SEM, $n=4$, $*p<0,05$).

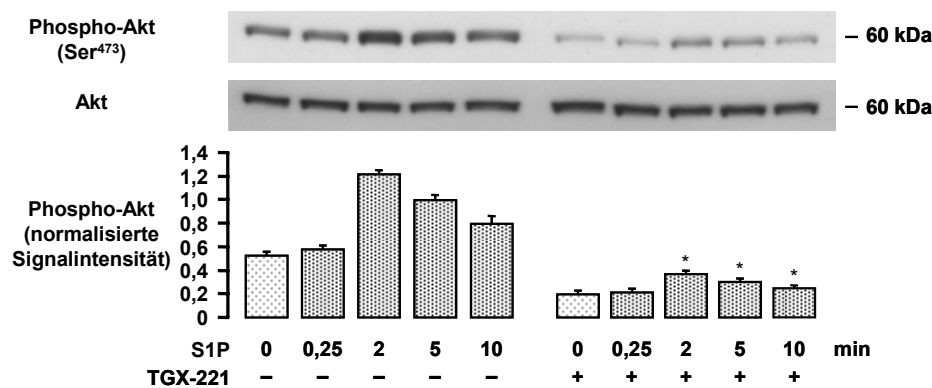


Abbildung 16: Wirkung von TGX-221 auf den zeitlichen Verlauf der S1P-induzierten Akt-Phosphorylierung in HUVEC

HUVEC wurden in 60-mm-Gewebekulturschalen ausgesät und drei Tage später für 5 h in wachstumsfaktorfreiem Medium inkubiert. Es folgten eine 30minütige Inkubation mit 0,1 μ M TGX-221, anschließend die Zugabe von 1 μ M S1P für 15 s bis 10 min sowie die Lyse der Zellen. Zur Western-Blot-Analyse wurden Proben mit je 50 μ g Gesamtproteingehalt verwendet. Für die Immundetektion wurden zunächst spezifische Phospho-Akt-Antikörper (Ser473) verwendet und anschließend Gesamt-Akt-Antikörper für die Gegenfärbung. Die Western Blots wurden densitometrisch ausgewertet, wobei die Normalisierung der Phospho-Akt-Signale gegen die entsprechenden Akt-Werte erfolgte. Die gezeigten Filmausschnitte sind repräsentativ für vier unabhängige Experimente. Das Diagramm zeigt die Mittelwerte der zugehörigen densitometrischen Daten \pm SEM (n=4). Die S1P-induzierte Zunahme der Akt-Phosphorylierung mit und ohne TGX-221-Behandlung wurde zu den jeweiligen Zeitpunkten verglichen; *p<0,5.

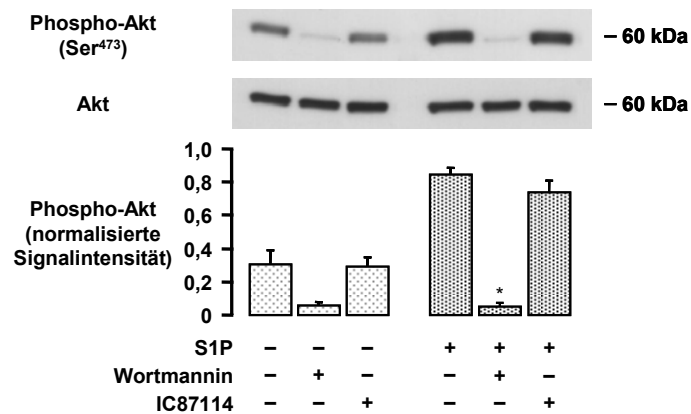


Abbildung 17: Wirkung von IC87114 auf die S1P-induzierte Akt-Phosphorylierung in HUVEC

HUVEC wurden in 60-mm-Gewebekulturschalen ausgesät und vier Tage später für 5 h in wachstumsfaktorfreiem Medium inkubiert. Es folgten eine 30minütige Inkubation mit 0,1 μ M Wortmannin oder 1 μ M IC87114, anschließend die Zugabe von 1 μ M S1P für 2 min und dann die Lyse der Zellen. Zur Western-Blot-Analyse wurden Proben mit je 50 μ g Gesamtproteingehalt verwendet. Für die Immundetektion wurden zunächst spezifische Phospho-Akt-Antikörper (Ser473) verwendet und anschließend Gesamt-Akt-Antikörper für die Gegenfärbung. Die Normalisierung der Phospho-Akt-Densitometriewerte erfolgte gegen die entsprechenden Akt-Werte. Die gezeigten Filmausschnitte sind repräsentativ für drei unabhängige Experimente. Das Diagramm zeigt die densitometrische Analyse der Experimente (Mittelwerte \pm SEM, n=3, *p<0,05).

3.2.4 Wirkung des Knockdown von p110 γ und p110 β

Die Isoform-spezifischen PI3K-Inhibitoren hemmen in einem bestimmten Konzentrationsbereich einzelne Isoformen selektiv, können mit steigender Inhibitorkonzentration jedoch auch die anderen Isoformen beeinflussen. Da unspezifische Nebenwirkungen deshalb nicht auszuschließen sind, wurden die mit Inhibitoren erhaltenen Daten mit der RNAi-Methode überprüft. Wie in Kapitel 3.1 beschrieben, konnte die Expression der katalytischen Untereinheiten der beiden G $_i$ -Protein-sensitiven PI3K-Isoformen, auf die sich diese Arbeit konzentriert, durch Einsatz von siRNA innerhalb von drei Tagen um 74 Prozent (p110 β , Abbildung 11) beziehungsweise 89 % (p110 γ , Abbildung 8) reduziert werden.

Die Zellen, in denen p110 β beziehungsweise p110 γ herunterreguliert und Zellen, die parallel mit Kontroll-siRNA inkubiert worden waren, wurden mit S1P stimuliert und die Akt-Phosphorylierung untersucht. Abbildung 18 zeigt, daß durch Behandlung der Zellen mit siRNA gegen p110 β sowohl die basale als auch die S1P-induzierte Akt-Phosphorylierung verringert wurde. Im Vergleich zur Kontroll-siRNA lag die Inhibition der S1P-induzierten Akt-Phosphorylierung bei 59 %. Diese Daten bestätigen die Ergebnisse der Inhibitorversuche und unsere Vermutung, daß S1P die Phosphorylierung von Akt über eine Aktivierung der PI3K β vermittelt. Eine Vorbehandlung der Zellen mit siRNA gegen p110 γ zeigte dagegen keine Hemmung der S1P-induzierten Akt-Phosphorylierung, was eine Rolle von PI3K γ in diesem Prozeß ausschließt.

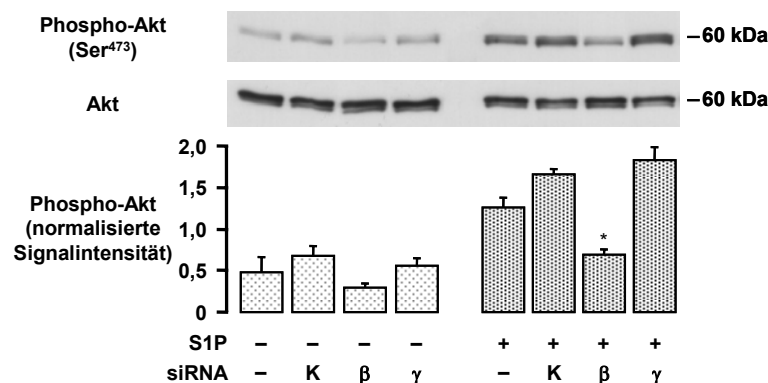


Abbildung 18: Wirkung der Reduktion einzelner PI3K-Isoformen auf die S1P-induzierte Akt-Phosphorylierung in HUVEC

HUVEC wurden in 30-mm-Gewebekulturschalen ausgesät und 24 h später mit 1 μ g Kontroll-siRNA (K), p110 β -siRNA (β) oder 1 μ g siRNA „D3g“ (γ) je Schale mit Hilfe von SAINT-RED transfiziert. Nach weiteren drei Tagen wurden die Zellen für 5 h in wachstumsfaktorfreiem Medium inkubiert, anschließend für 2 min mit 1 μ M S1P stimuliert und dann lysiert. Zur Western-Blot-Analyse wurden Proben mit je 40 μ g Gesamtproteingehalt verwendet. Für die Immundetektion wurden zunächst spezifische Phospho-Akt-Antikörper (Ser473) verwendet und anschließend Gesamt-Akt-Antikörper für die Gegenfärbung. Die Normalisierung der Phospho-Akt-Densitometriewerte erfolgte gegen die entsprechenden Akt-Werte. Die gezeigten Filmausschnitte sind repräsentativ für drei unabhängige Experimente. Das Diagramm zeigt die densitometrische Analyse der Experimente (Mittelwerte \pm SEM, n=3, *p<0,05)

3.2.5 RT-PCR zum Nachweis von p101 und p87

Da PI3K γ durch G $_i$ - $\beta\gamma$ -Untereinheiten aktiviert wird und S1P über G $_i$ -gekoppelte Rezeptoren Signalkaskaden auslöst, war es überraschend festzustellen, daß sie in HUVEC nicht zur S1P-induzierten Aktivierung von Akt beiträgt. Eine Erklärungsmöglichkeit ist, daß PI3K γ in HUVEC nach Stimulation mit S1P wenig oder kein PtdIns(4,5)P $_2$ in PIP $_3$ umwandeln kann. Mögliche Ursachen dafür könnten unter anderem in einer veränderten Expression der regulatorischen Untereinheiten p101 und p87 liegen. Um die Expression von p101 und p87 zu untersuchen, wurde die RT-PCR-Methode angewandt. Western-Blot-Analysen waren auf Grund nicht verfügbarer Antikörper nicht möglich. Abbildung 19 zeigt, daß beide regulatorischen Untereinheiten in den als Positivkontrolle verwendeten Jurkat-Zellen gut nachweisbar, in HUVEC jedoch nicht detektierbar sind.

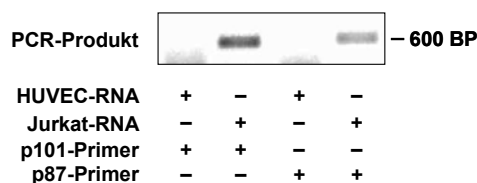


Abbildung 19: RT-PCR zum Nachweis von p101 und p87 in HUVEC

Nach Isolation der Gesamt-RNA aus HUVEC und Jurkat-Zellen wurden RT-PCRs mit 1 μ g RNA je Ansatz durchgeführt. Auf die 30minütige reverse Transkription folgten 30 PCR-Zyklen. Nach Beendigung der Reaktion wurde 1/4 des jeweiligen Reaktionsansatzes elektrophoretisch im 1%igen Agarosegel getrennt. Zur besseren Darstellung wurde das Digitalfoto invertiert.

3.3 S1P-induzierte Phosphorylierung von eNOS

Ein wichtiges Substrat von Akt in Endothelzellen ist eNOS, das für die NO-Produktion verantwortliche Enzym. NO reguliert Gefäßtonus und vaskuläre Homöostase und spielt eine Rolle in der Angiogenese (Shiojima & Walsh 2002). Akt phosphoryliert eNOS am Serinrest 1177. Diese Phosphorylierung stellt einen wichtigen Prozeß der eNOS-Aktivierung dar und wurde nach Stimulierung von HUVEC mit S1P bereits beobachtet. Hier sollte untersucht werden, welche Bedeutung der PI3K β /Akt-Signalweg für die Phosphorylierung der eNOS hat.

3.3.1 Zeitlicher Verlauf

Zunächst wurde die Zeitabhängigkeit der eNOS-Phosphorylierung nach Stimulation mit S1P untersucht. Abbildung 20 zeigt, daß das Maximum der eNOS-Phosphorylierung bereits 15 s nach S1P-Zusatz erreicht ist, das Signal dann etwa bis 2 min konstant bleibt und danach wieder abfällt. Diese Kinetik unterscheidet sich deutlich von der Kinetik der Akt-Phosphorylierung, die im Vergleich zur eNOS-Phosphorylierung verzögert abläuft (kein signifikantes Signal bei 15 s, Maximum bei 2 min). Diese Daten lassen vermuten, daß zumindest die frühe Phase der eNOS-Phosphorylierung nicht durch Akt, sondern durch eine andere Kinase vermittelt wird.

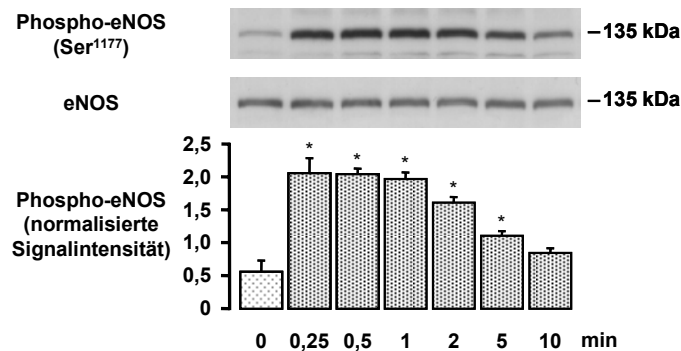


Abbildung 20: Zeitlicher Verlauf der S1P-induzierte eNOS-Phosphorylierung in HUVEC

HUVEC wurden in 60-mm-Gewebekulturschalen ausgesät und drei Tage später für 5 h in wachstumsfaktorfreiem Medium inkubiert. Dann erfolgte die Zugabe von 1 μ M S1P für 15 s bis 10 min mit anschließender Zell-Lyse. Zur Western-Blot-Analyse wurden Proben mit je 50 μ g Gesamtproteingehalt verwendet. Für die Immundetektion wurden zunächst spezifische Phospho-eNOS-Antikörper (Ser1177) verwendet und anschließend Gesamt-eNOS-Antikörper für die Gegenfärbung. Die Normalisierung der Phospho-eNOS-Densitometriewerte erfolgte gegen die entsprechenden eNOS-Werte. Die gezeigten Filmausschnitte sind repräsentativ für drei unabhängige Experimente. Das Diagramm zeigt die densitometrische Analyse der Experimente (Mittelwerte \pm SEM, $n=3$, $*p<0,05$).

3.3.2 Wirkung von TGX-221

Da die vorhergehenden Experimente die PI3K β -Isoform als die für die Akt-Phosphorylierung verantwortliche PI3K identifiziert hatten, wurde der Einfluß des PI3K β -Inhibitors TGX-221 auf die S1P-stimulierte eNOS-Phosphorylierung in HUVEC untersucht. Abbildung 21 zeigt die Wirkung aufsteigender Konzentrationen von TGX-221 auf die Ser1177-Phosphorylierung. TGX-221 führte zwar zu einer Verminderung der eNOS-Phosphorylierung, der Effekt ging aber nicht über eine 34%ige Hemmung hinaus, obwohl unter den gleichen Bedingungen die Akt-Phosphorylierung vollständig gehemmt war (Abbildung 15). Möglicherweise ist daher der PI3K β /Akt-Signalweg nur für etwa ein Drittel der S1P-induzierten eNOS-Phosphorylierung verantwortlich.

In einer zweiten Serie von Experimenten wurde der zeitliche Verlauf der S1P-induzierten eNOS-Phosphorylierung in An- und Abwesenheit von TGX-221 untersucht. Abbildung 22 zeigt, daß TGX-221 im Vergleich zur zeitgleichen Kontrollprobe nur zu späteren Zeitpunkten zu einer deutlichen Hemmung der S1P-induzierten eNOS-Phosphorylierung führt (10 min: 44 % Hemmung). Die TGX-221-sensitive und damit Akt-abhängige eNOS-Phosphorylierung scheint daher initial keine Rolle zu spielen und im Verlauf der Stimulation an Bedeutung zu gewinnen. Dagegen scheint der TGX-221-resistente (wahrscheinlich Akt-unabhängige) Mechanismus der eNOS-Aktivierung zu Beginn der Stimulation zu dominieren.

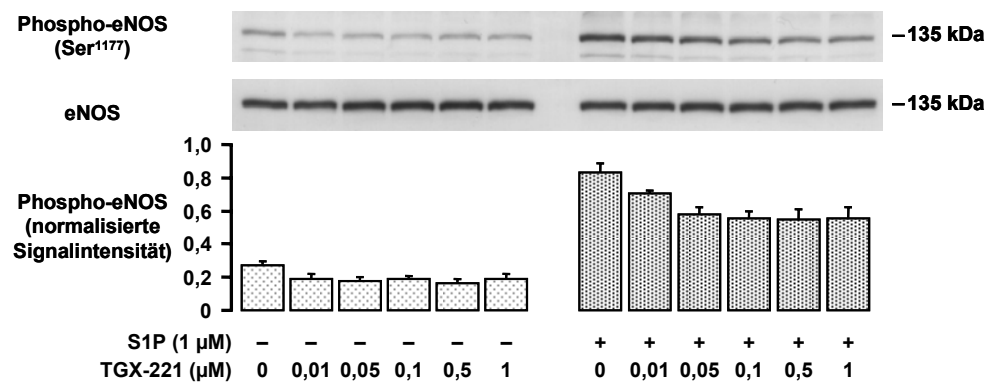


Abbildung 21: Wirkung von TGX-221 auf die S1P-induzierte eNOS-Phosphorylierung in HUVEC

HUVEC wurden in 60-mm-Gewebekulturschalen ausgesät und drei Tage später für 5 h in wachstumsfaktorfreiem Medium inkubiert. Es folgten eine 30minütige Inkubation mit TGX-221 (0,01 bis 1 μ M), anschließend die Zugabe von 1 μ M S1P für 2 min und dann die Lyse der Zellen. Zur Western-Blot-Analyse wurden Proben mit je 50 μ g Gesamtproteingehalt verwendet. Für die Immundetektion wurden zunächst spezifische Phospho-eNOS-Antikörper (Ser1177) verwendet und anschließend Gesamt-eNOS-Antikörper für die Gegenfärbung. Die Normalisierung der Phospho-eNOS-Densitometriewerte erfolgte gegen die entsprechenden eNOS-Werte. Die gezeigten Filmausschnitte sind repräsentativ für vier unabhängige Experimente. Das Diagramm zeigt die densitometrische Analyse der Experimente (Mittelwerte \pm SEM, n=4, *p<0,05)

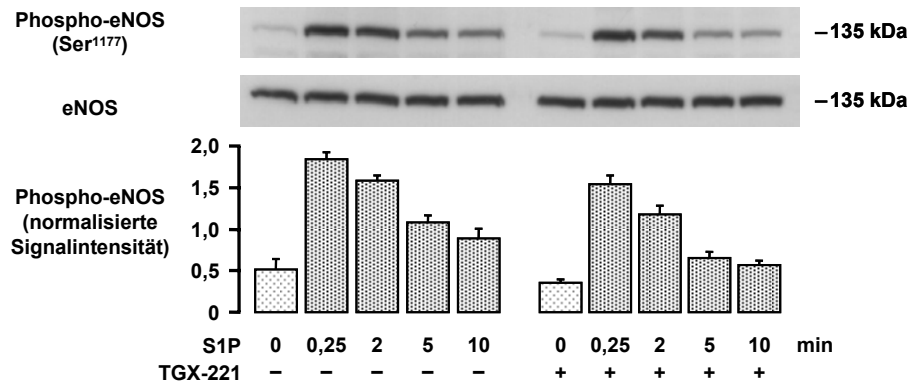


Abbildung 22: Wirkung von TGX-221 auf den zeitlichen Verlauf der S1P-induzierten eNOS-Phosphorylierung in HUVEC

HUVEC wurden in 60-mm-Gewebekulturschalen ausgesät und drei Tage später für 5 h in wachstumsfaktorfreiem Medium inkubiert. Es folgten eine 30minütige Vorinkubation mit 0,1 μ M TGX-221, anschließend die Stimulation mit 1 μ M S1P für 15 s bis 10 min und danach die zeitgleiche Lyse von TGX-221-behandelten und Kontrollzellen. Zur Western-Blot-Analyse wurden Proben mit je 50 μ g Gesamtproteingehalt verwendet. Für die Immundetektion wurden zunächst spezifische Phospho-eNOS-Antikörper (Ser1177) verwendet und anschließend Gesamt-eNOS-Antikörper für die Gegenfärbung. Die Normalisierung der Phospho-eNOS-Densitometriewerte erfolgte gegen die entsprechenden eNOS-Werte. Die gezeigten Filmausschnitte sind repräsentativ für vier unabhängige Experimente. Das Diagramm zeigt die densitometrische Analyse der Experimente (Mittelwerte \pm SEM, n=4)

3.3.3 Wirkung des Calcium-Chelators BAPTA-AM

Die Kinetik der eNOS-Phosphorylierung mit einem Maximum bei 15 s und die aus der Literatur bekannte Kinetik der intrazellulären Calcium-Erhöhung nach Zellstimulierung legen die Vermutung nahe, daß eine calciumabhängige Kinase in die eNOS-Phosphorylierung einbezogen ist. Zudem ist bekannt, daß S1P den PLC/Inositoltrisphosphat/ Ca^{2+} -Signalweg initiiert (Kluk & Hla 2002) und daß der Ser1177-Rest der eNOS auch durch die calciumabhängige CaMKII phosphoryliert werden kann (Fleming *et al.* 2001).

Um die Calciumabhängigkeit der S1P-induzierten eNOS-Phosphorylierung zu untersuchen, wurde der zellmembranpermeable Calcium-Chelator BAPTA-AM verwendet. Abbildung 23 zeigt, daß BAPTA-AM bereits den basalen Phosphorylierungszustand von Ser1177 verringert. Außerdem kommt es nach S1P-Stimulation nur noch zu einem minimalen Anstieg der eNOS-Phosphorylierung. Unsere Daten zeigen damit, daß die S1P-induzierte eNOS-Phosphorylierung ein weitgehend calciumabhängiger Prozeß ist.

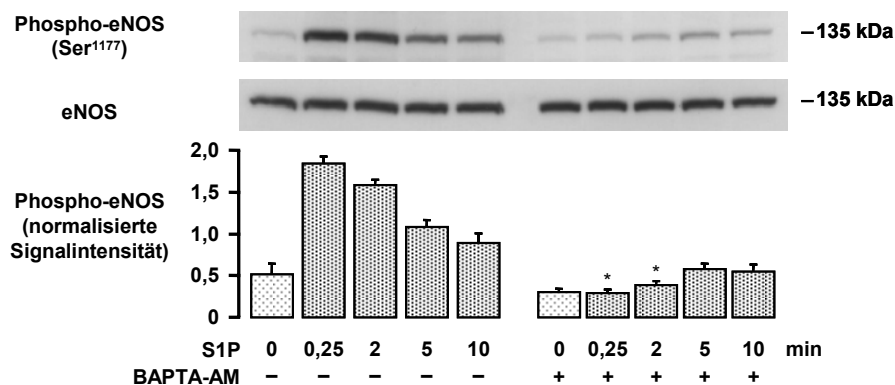


Abbildung 23: Calciumabhängigkeit der S1P-induzierten eNOS-Phosphorylierung in HUVEC
HUVEC wurden in 60-mm-Gewebekulturschalen ausgesät und drei Tage später für 5 h in wachstumsfaktorfreiem Medium inkubiert. Es folgten eine 30minütige Inkubation mit 20 μM BAPTA-AM, anschließend die Zugabe von 1 μM S1P für 15 s bis 10 min und dann die Lyse der Zellen. Zur Western-Blot-Analyse wurden Proben mit je 50 μg Gesamtproteingehalt verwendet. Für die Immundetektion wurden zunächst spezifische Phospho-eNOS-Antikörper (Ser1177) verwendet und anschließend Gesamt-eNOS-Antikörper für die Gegenfärbung. Die Normalisierung der Phospho-eNOS-Densitometriewerte erfolgte gegen die entsprechenden eNOS-Werte. Die gezeigten Filmausschnitte sind repräsentativ für vier unabhängige Experimente. Das Diagramm zeigt die densitometrische Analyse der Experimente (Mittelwerte \pm SEM, $n=4$, $*p<0,05$).

Die starke Hemmung der eNOS-Phosphorylierung durch BAPTA-AM deutet darauf hin, daß auch der Akt-abhängige Anteil an der eNOS-Phosphorylierung durch die Verminderung intrazellulärer Calciumspiegel beeinträchtigt ist. Deshalb wurde auch die Calciumabhängigkeit der Akt-Phosphorylierung nach S1P-Stimulation untersucht. Abbildung 24 zeigt, daß auch die S1P-induzierte Phosphorylierung von Akt durch BAPTA-AM deutlich gehemmt wird, was eine Differenzierung von potentiell CaMKII- und Akt-abhängigen Prozessen anhand dieser Daten schwierig macht.

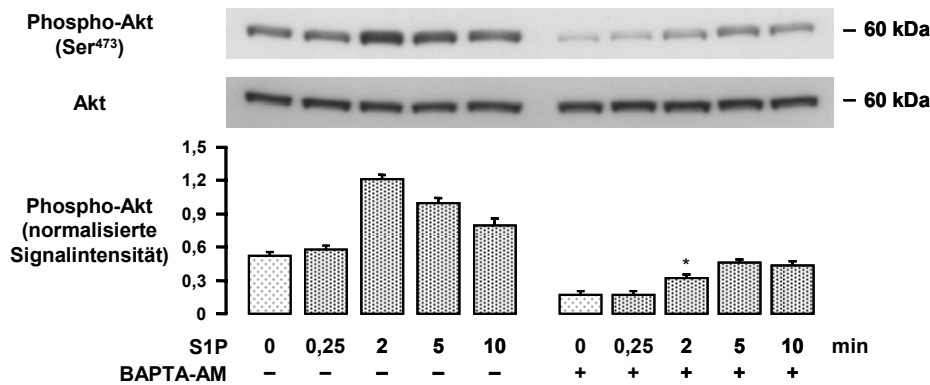


Abbildung 24: Calciumabhängigkeit der S1P-induzierten Akt-Phosphorylierung in HUVEC

HUVEC wurden in 60-mm-Gewebekulturschalen ausgesät und drei Tage später für 5 h in wachstumsfaktorfreiem Medium inkubiert. Es folgten eine 30minütige Inkubation mit 20 μ M BAPTA-AM, anschließend die Zugabe von 1 μ M S1P für 15 s bis 10 min und dann die Lyse der Zellen. Zur Western-Blot-Analyse wurden Proben mit je 50 μ g Gesamtproteingehalt verwendet. Für die Immundetektion wurden zunächst spezifische Phospho-Akt-Antikörper (Ser473) verwendet und anschließend Gesamt-Akt-Antikörper für die Gegenfärbung. Die Normalisierung der Phospho-Akt-Densitometriewerte erfolgte gegen die entsprechenden Akt-Werte. Die gezeigten Filmausschnitte sind repräsentativ für vier unabhängige Experimente. Das Diagramm zeigt die densitometrische Analyse der Experimente (Mittelwerte \pm SEM, $n=4$, $*p<0,05$).

3.3.4 cGMP-Messungen

Ein wichtiges Zielprotein des durch eNOS produzierten NO ist die lösliche Guanylatzyklase, deren Produkt cGMP zur Relaxation glatter Muskelzellen führt (Pacher *et al.* 2007). Die cGMP-Bestimmung ist daher eine anerkannte Methode zur Messung der NO-Bioaktivität. cGMP wird dabei nach Zellstimulierung in Anwesenheit eines Phosphodiesterase-Hemmstoffs, welcher den Abbau von cGMP verhindert und dessen Akkumulation ermöglicht, gemessen. Stimulierung von HUVEC mit S1P (1 μ M, 15 min) führte zu einer Verdoppelung der cGMP-Menge (Kontrolle: $0,84 \pm 0,19$ pmol cGMP/mg Protein; 1 μ M S1P: $2,06 \pm 0,61$ pmol cGMP/mg Protein, $n=3$). Im Vergleich zu anderen Stimuli ist dieser Anstieg jedoch moderat. 1 U/ml Thrombin und 50 ng/ml VEGF wurden als Vergleichsubstanzen verwendet und führten zu einer Verzehnfachung ($13,4 \pm 0,70$ pmol cGMP/mg Protein, $n=3$) beziehungsweise Verzwanzigfachung ($22,4 \pm 2,5$, $n=3$) der Kontrollwerte. Interessanterweise ist auch die eNOS-Phosphorylierung nach S1P deutlich schwächer als die nach Thrombin oder VEGF (Daten nicht gezeigt).

3.4 S1P-induzierte Phosphorylierung von ERK1/2

Eine weiterer Signalweg, der durch S1P initiiert wird, ist die ERK1/2-MAPK-Kaskade (Kluk & Hla 2002), wobei auch hier nicht klar ist, inwieweit PI3Ks generell und welche PI3K-Isoformen im besonderen in diesem Signalweg eine Rolle spielen. Diese Fragestellung wurde im Folgenden untersucht.

3.4.1 Zeitlicher Verlauf

Um Änderungen der S1P-induzierten ERK1/2-Phosphorylierung nach Einfluß verschiedener Inhibitoren gut beurteilen zu können, wurden auch hier zunächst Bedingungen identifiziert, unter denen maximale Phosphorylierungssignale auftreten. Deshalb wurde der zeitliche Verlauf der S1P-induzierten ERK1/2-Phosphorylierung an den Aminosäureresten Threonin 202 und Tyrosin 204 untersucht. Das stärkste Signal konnte im Bereich von zwei bis fünf Minuten detektiert werden. Für die weiteren Experimente wurde daher eine Stimulationszeit von 2 min gewählt (Abbildung 25).

3.4.2 Wirkung von Tyrosinkinase-Inhibitoren

Wie bereits diskutiert, kann S1P zu einer Transaktivierung von Rezeptortyrosinkinasen wie VEGF-Rezeptor oder EGF-Rezeptor führen. Diese kann auch eine Rolle bei der Vermittlung der S1P-induzierten ERK1/2-Phosphorylierung spielen, da die Aktivierung der MAPK-Kaskade-auslösenden Ras-Isoformen durch Rezeptortyrosinkinasen erfolgen kann. Unsere Daten zeigen jedoch, daß eine Hemmung von VEGF-Rezeptor (VEGFR2) durch SU5614 oder von EGF-Rezeptor durch AG1478 keinen Einfluß auf die ERK1/2-Phosphorylierung hat (Abbildung 26). Auch der generelle Tyrosinkinase-Inhibitor Genistein zeigt keine Wirkung, so daß zu vermuten ist, daß Tyrosinkinasen keine wichtige Rolle bei der S1P-induzierten ERK1/2-Aktivierung spielen.

3.4.3 Wirkung verschiedener PI3K-Inhibitoren

Um die Frage zu klären, ob PI3K-Isoformen an der Vermittlung der S1P-induzierten ERK1/2-Aktivierung beteiligt sind, wurden die gleichen Zugänge wie in Kapitel 3.2. gewählt. Unsere Daten zeigen, daß der Signalweg von S1P zu ERK1/2 ebenso wie der zu Akt durch Wortmannin und Pertussistoxin gehemmt wird und damit über heterotrimere G_i -Proteine (Abbildung 27) und PI3Ks verläuft. Interessanterweise zeigten TGX-221 und AS-252424 jedoch keine inhibitorische Wirkung. Wir mußten daher zunächst vermuten, daß PI3K α oder PI3K δ für die Aktivierung der ERK1/2-MAPK-Kaskade verantwortlich sind, obwohl bisher angenommen wird, daß die Aktivierung dieser PI3K-Isoformen über Tyrosinkinase-Rezeptoren erfolgt und die Rolle von Tyrosinkinasen in unserem Testsystem nahezu ausgeschlossen wurde (Abbildung 26). Untersuchungen mit einem Inhibitor der PI3K δ (IC87114) zeigten, daß diese PI3K-Isoform ebenfalls nicht in die Vermittlung der S1P-induzierten ERK1/2-Phosphorylierung einbezogen ist (Abbildung 28). Im Gegenteil, IC87114 führte sogar zu einer leichten Steigerung des Phosphorylierungssignals, so daß die PI3K δ die ERK1/2-Phosphorylierung möglicherweise sogar hemmt. Wir schlußfolgern daher, daß die PI3K α für die Vermittlung der S1P-Signale zur ERK1/2-MAPK-Kaskade verantwortlich ist. Ein entsprechender PI3K α -Inhibitor stand jedoch zum Zeitpunkt unserer Experimente nicht zur Verfügung. Der entsprechende Signalweg muß in weiterführenden Untersuchungen aufgeklärt werden.

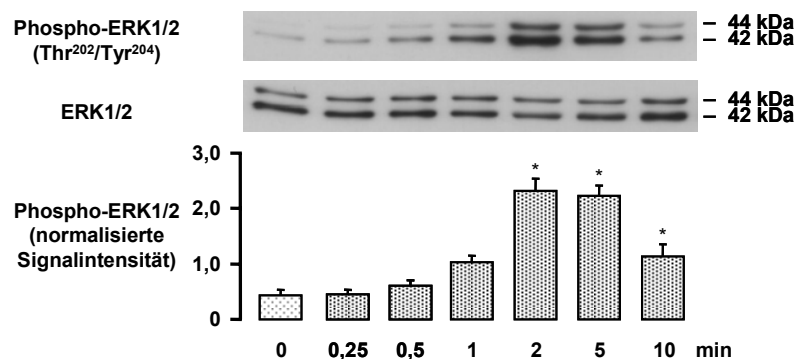


Abbildung 25: Zeitlicher Verlauf der S1P-induzierten ERK1/2-Phosphorylierung

HUVEC wurden in 60-mm-Gewebekulturschalen ausgesät und drei Tage später für 5 h in wachstumsfaktorfreiem Medium inkubiert. Dann erfolgte die Zugabe von 1 μ M S1P für 15 s bis 10 min mit anschließender Zell-Lyse. Zur Western-Blot-Analyse wurden Proben mit je 50 μ g Gesamtproteingehalt verwendet. Für die Immundetektion wurden zunächst spezifische Phospho-ERK1/2-Antikörper (Thr²⁰²/Tyr²⁰⁴) verwendet und anschließend Gesamt-ERK1/2-Antikörper für die Gegenfärbung. Die Normalisierung der Phospho-ERK1/2-Densitometriewerte erfolgte gegen die entsprechenden ERK1/2-Werte. Die gezeigten Filmausschnitte sind repräsentativ für drei unabhängige Experimente. Das Diagramm zeigt die densitometrische Auswertung der Signalintensitäten (Mittelwerte \pm SEM, n=3, *p<0,05).

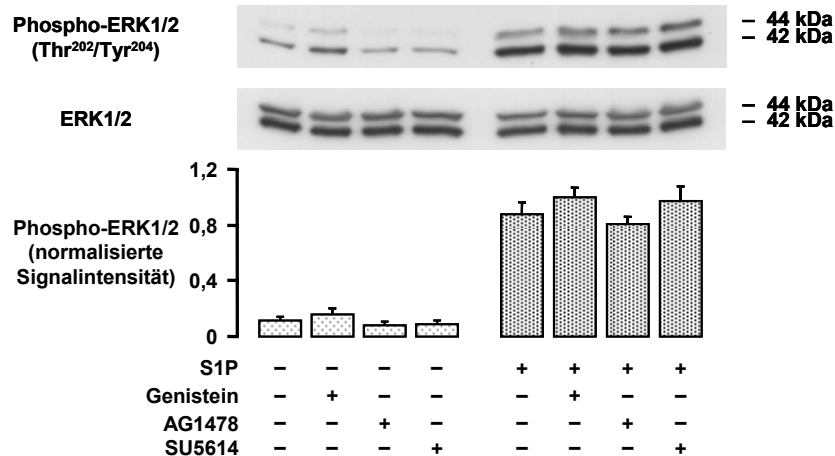


Abbildung 26: Einfluß von Tyrosinkinase-Inhibitoren auf die S1P-induzierte ERK1/2-Phosphorylierung in HUVEC

HUVEC wurden in 60-mm-Gewebekulturschalen ausgesät und vier Tage später für 5 h in wachstumsfaktorfreiem Medium inkubiert. Es folgten eine 30minütige Inkubation mit Tyrosinkinase-Inhibitoren (10 μ M Genistein, 1 μ M AG1478, 10 μ M SU5614), anschließend die Zugabe von 1 μ M S1P für 2 min und dann die Lyse der Zellen. Zur Western-Blot-Analyse wurden Proben mit je 50 μ g Gesamtproteingehalt verwendet. Für die Immundetektion wurden zunächst spezifische Phospho-ERK1/2-Antikörper verwendet und anschließend Gesamt-ERK1/2-Antikörper für die Gegenfärbung. Die Normalisierung der Phospho-ERK1/2-Densitometriewerte erfolgte gegen die entsprechenden ERK1/2-Werte. Die gezeigten Filmausschnitte sind repräsentativ für drei unabhängige Experimente. Das Diagramm zeigt die densitometrische Auswertung der Signalintensitäten (Mittelwerte \pm SEM, n=3).

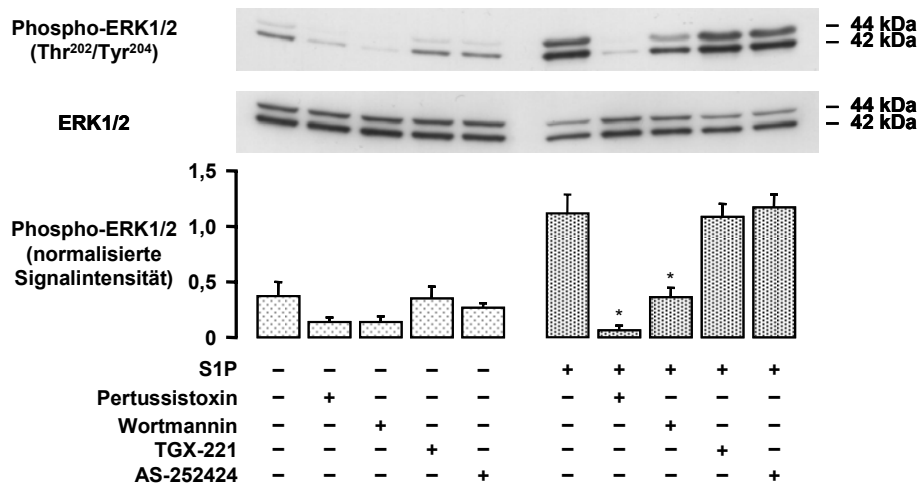


Abbildung 27: Einfluß von Pertussis toxin und PI3K-Inhibitoren auf die S1P-induzierte ERK1/2-Phosphorylierung in HUVEC

HUVEC wurden in 60-mm-Gewebekulturschalen ausgesät und drei Tage später für 5 h in wachstumsfaktorfreiem Medium inkubiert. Pertussis toxin (500 ng/ml) wurde bereits 3 h vor Ablauf dieser Inkubationszeit zugesetzt. Es folgten eine 30minütige Inkubation mit PI3K-Inhibitoren (0,1 µM Wortmannin, 0,1 µM TGX-221, 1 µM AS-252424), anschließend die Stimulation mit 1 µM S1P für 2 min und dann die Lyse der Zellen. Zur Western-Blot-Analyse wurden Proben mit je 50 µg Gesamtproteingehalt verwendet. Für die Immundetektion wurden zunächst spezifische Phospho-ERK1/2-Antikörper verwendet und anschließend Gesamt-ERK1/2-Antikörper für die Gegenfärbung. Die Normalisierung der Phospho-ERK1/2-Densitometriewerte erfolgte gegen die entsprechenden ERK1/2-Werte. Die gezeigten Filmausschnitte sind repräsentativ für vier unabhängige Experimente. Das Diagramm zeigt die densitometrische Auswertung der Signalintensitäten (Mittelwerte ± SEM, n=4, *p<0,05).

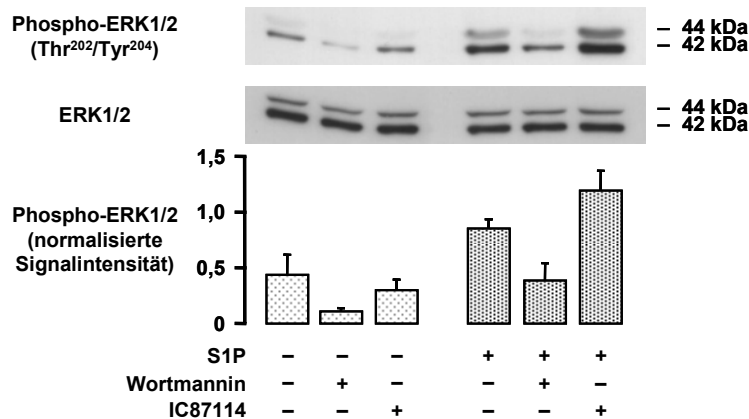


Abbildung 28: Einfluß von PI3Kδ-Inhibitor IC87114 auf die S1P-induzierte ERK1/2-Phosphorylierung in HUVEC

HUVEC wurden in 60-mm-Gewebekulturschalen ausgesät und vier Tage später für 5 h in wachstumsfaktorfreiem Medium inkubiert. Es folgten eine 30minütige Inkubation mit 0,1 µM Wortmannin oder 1 µM IC87114, anschließend die Stimulation mit 1 µM S1P für 2 min und dann die Lyse der Zellen. Zur Western-Blot-Analyse wurden Proben mit je 50 µg Gesamtproteingehalt verwendet. Für die Immundetektion wurden zunächst spezifische Phospho-ERK1/2-Antikörper verwendet und anschließend Gesamt-ERK1/2-Antikörper für die Gegenfärbung. Die Normalisierung der Phospho-ERK1/2-Densitometriewerte erfolgte gegen die entsprechenden ERK1/2-Werte. Die gezeigten Filmausschnitte sind repräsentativ für drei unabhängige Experimente. Das Diagramm zeigt die densitometrische Auswertung der Signalintensitäten (Mittelwerte ± SEM, n=3).

3.4.4 Wirkung des Calcium-Chelators BAPTA-AM

Um zu untersuchen, ob die S1P-induzierte ERK1/2-Phosphorylierung calciumabhängig verläuft, wurde der Calcium-Chelator BAPTA-AM eingesetzt. Abbildung 29 zeigt, daß das maximale Phosphorylierungssignal von ERK1/2 nach S1P-Stimulierung nicht durch BAPTA-AM verringert wird. Dagegen verschiebt sich der Zeitpunkt der maximalen ERK1/2-Phosphorylierung vom Bereich zwischen zwei und fünf Minuten (ohne BAPTA-AM) auf den Bereich um zehn Minuten (mit BAPTA-AM). Diese Daten könnten dafür sprechen, daß ein calciumabhängiger Prozeß in die Aktivierung von ERK1/2 einbezogen ist, der zeitlich verzögert durch andere Prozesse ersetzt werden kann.

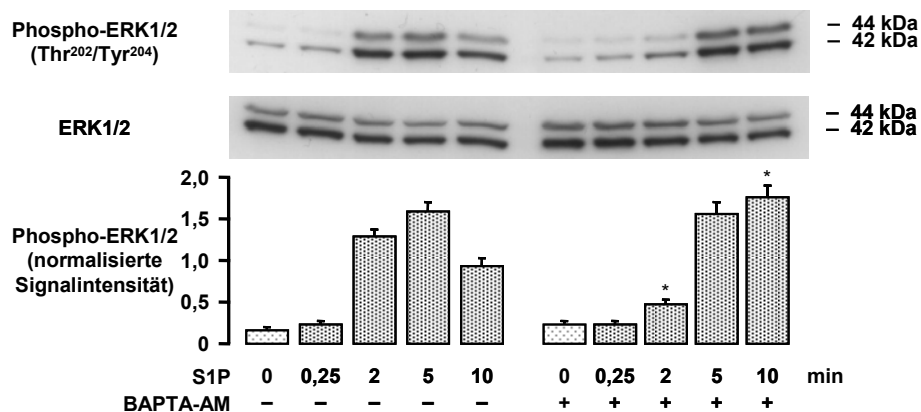


Abbildung 29: Calciumabhängigkeit der S1P-induzierten ERK1/2-Phosphorylierung in HUVEC

HUVEC wurden in 60-mm-Gewebekulturschalen ausgesät und drei Tage später für 5 h in wachstumsfaktorfreiem Medium inkubiert. Es folgten eine 30minütige Inkubation mit 20 µM BAPTA-AM, anschließend die Stimulation mit 1 µM S1P für 15 s bis 10 min und dann die Lyse der Zellen. Zur Western-Blot-Analyse wurden Proben mit je 50 µg Gesamtproteingehalt verwendet. Für die Immundetektion wurden zunächst spezifische Phospho-ERK1/2-Antikörper verwendet und anschließend Gesamt-ERK1/2-Antikörper für die Gegenfärbung. Die Normalisierung der Phospho-ERK1/2-Densitometriewerte erfolgte gegen die entsprechenden ERK1/2-Werte. Die gezeigten Filmausschnitte sind repräsentativ für vier unabhängige Experimente. Das Diagramm zeigt die densitometrische Auswertung der Signalintensitäten (Mittelwerte ± SEM, n=4, *p<0,05).

3.5 S1P-induzierte Aktivierung von Rac1

Die Rho-GTPase Rac1 spielt bei der S1P-induzierten Migration von HUVEC eine wichtige Rolle (Li *et al.* 2005). Obwohl bekannt ist, daß PI3Ks in die Rac1-Aktivierung involviert sein können (Fukata *et al.* 2003), ist nicht geklärt, wie diese Aktivierung durch S1P erfolgt und welche Funktion PI3K-Isoformen und der PI3K/Akt-Signalweg dabei haben. Diese Fragen wurden in den folgenden Experimenten untersucht. Die Rac1-Aktivitätsmessung erfolgte durch Isolation von GTP-gebundenem Rac mittels CRIB-GST und der selektiven Detektion von Rac1 im Western Blot.

3.5.1 Zeitlicher Verlauf und Wirkung verschiedener PI3K-Inhibitoren

Die Untersuchung des zeitlichen Verlaufs der Rac1-Aktivierung nach S1P-Stimulation zeigte das Maximum bei 1 min (Abbildung 30). Die S1P-induzierte Rac1-Aktivierung wurde durch den nichtselektiven PI3K-Inhibitor Wortmannin um 46 % gehemmt (Abbildung 31) und verläuft damit partiell PI3K-abhängig. Um die Rolle der beteiligten PI3K-Isoformen zu untersuchen, wurden wie in den vorangegangenen Experimenten die Isoform-spezifischen Inhibitoren TGX-221 (für PI3K β) und AS-252424 (für PI3K γ) eingesetzt. TGX-221 führte zu einer Hemmung der Rac1-Aktivierung um 45 %, während AS252424 eine Hemmung von 41 % bewirkte (Abbildung 31). Beide Isoformen sind also gleichermaßen in die Rac1-Aktivierung durch S1P involviert.

3.5.2 Untersuchung von Rac-Akt-Interaktionen

Aus der Literatur ist bekannt, daß PI3Ks die Rac1-Aktivierung entweder über PIP₃-abhängige Rac1-GEFs (Fukata *et al.* 2003) oder über die Akt-vermittelte Phosphorylierung des S1P₁-Rezeptors bewirken können (Lee *et al.* 2001). Andererseits gibt es Arbeiten, die zeigen, daß Rac1 für die S1P-induzierte Akt-Phosphorylierung essentiell ist (Gonzalez *et al.* 2006).

Um die Interaktion von Rac1 und Akt in unserem System zu untersuchen, wurde zunächst ein Akt1/2-Inhibitor eingesetzt und seine Wirkung auf die Rac1-Aktivierung überprüft. Dieser Inhibitor führte zu einer vollständigen Unterdrückung des basalen und des S1P-induzierten Phospho-Akt-Signals (Abbildung 32). Da in HUVEC nur die Isoformen Akt1 und Akt3 exprimiert sind (Fieber *et al.* 2006), kann man schlußfolgern, daß ausschließlich Akt1 durch S1P aktiviert wird. Durch Akt1-Inhibition konnte allerdings keine Verringerung der S1P-induzierten Rac1-Aktivierung erreicht werden (Abbildung 32). Die Vorbehandlung der Zellen mit dem Akt1/2-Inhibitor führte sogar zu einer Verstärkung der S1P-induzierten Rac1-Aktivierung (Abbildung 32). Akt1 ist somit kein Vermittler der Rac1-Aktivierung nach S1P-Stimulation in HUVEC.

Um zu untersuchen, ob umgekehrt Rac1 für die Aktivierung von Akt nötig ist, wurde der spezifische Rac1-Inhibitor NSC-23766 eingesetzt. Abbildung 33 zeigt, daß Rac1-Inhibition keinen Einfluß auf die S1P-induzierte Akt-Aktivierung hat und somit aktives Rac1 nicht für die Akt-Phosphorylierung benötigt wird.

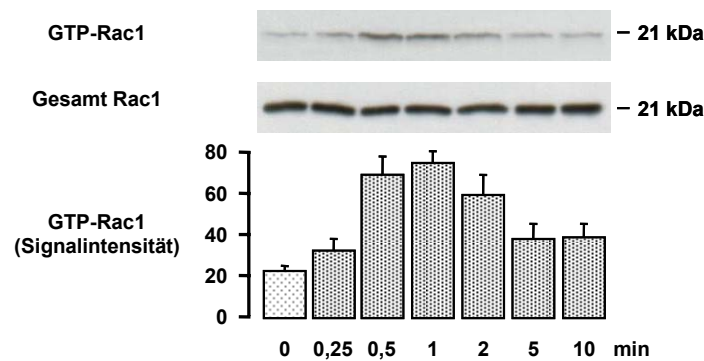


Abbildung 30: Zeitlicher Verlauf der S1P-induzierten Rac1-Aktivierung

HUVEC wurden in 60-mm-Gewebekulturschalen ausgesät und drei Tage später für 5 h in wachstumsfaktorfreiem Medium inkubiert. Dann erfolgte die Zugabe von 1 μ M S1P für 15 s bis 10 min mit anschließender Zell-Lyse. Zum Vergleich des Rac1-Gehaltes der verschiedenen Lysate wurden Proben mit je 10 μ g Gesamtproteingehalt im Western Blot untersucht. Zur Analyse der Rac1-Aktivierung wurde GTP-Rac1 mittels CRIB-GST und GSH-Sepharose aus Proben mit je 200 μ g Gesamtproteingehalt isoliert und ebenfalls im Western Blot untersucht. Für die Immundetektion wurde ein spezifischer Rac1-Antikörper verwendet. Die gezeigten Filmausschnitte sind repräsentativ für drei unabhängige Experimente. Das Diagramm zeigt die Daten der densitometrische Auswertung (Mittelwerte \pm SEM, n=3).

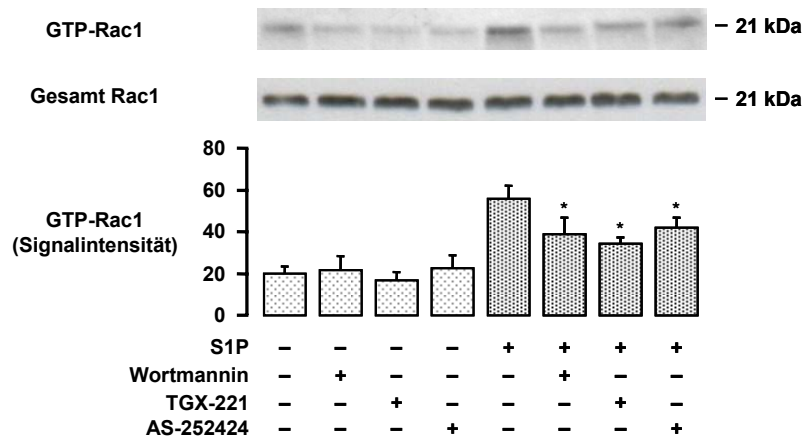


Abbildung 31: Wirkung von PI3K-Inhibitoren auf die S1P-induzierte Rac1-Aktivierung in HUVEC

HUVEC wurden in 60-mm-Gewebekulturschalen ausgesät und drei Tage später für 5 h in wachstumsfaktorfreiem Medium inkubiert. In parallelen Schalen erfolgte eine 30minütige Vorinkubation mit PI3K-Inhibitoren (0,1 μ M Wortmannin, 0,1 μ M TGX-221, 1 μ M AS-252424), anschließend die Zugabe von 1 μ M S1P für 1 min und dann die Lyse der Zellen. Zum Vergleich des Rac1-Gehaltes der verschiedenen Lysate wurden Proben mit je 10 μ g Gesamtproteingehalt im Western Blot untersucht. Zur Analyse der Rac1-Aktivierung wurde GTP-Rac1 mittels CRIB-GST und GSH-Sepharose aus Proben mit je 200 μ g Gesamtproteingehalt isoliert und ebenfalls im Western Blot untersucht. Für die Immundetektion wurde ein spezifischer Rac1-Antikörper verwendet. Die gezeigten Filmausschnitte sind repräsentativ für vier unabhängige Experimente. Das Diagramm zeigt die Daten der densitometrische Auswertung (Mittelwerte \pm SEM, n=4, *p<0,05).

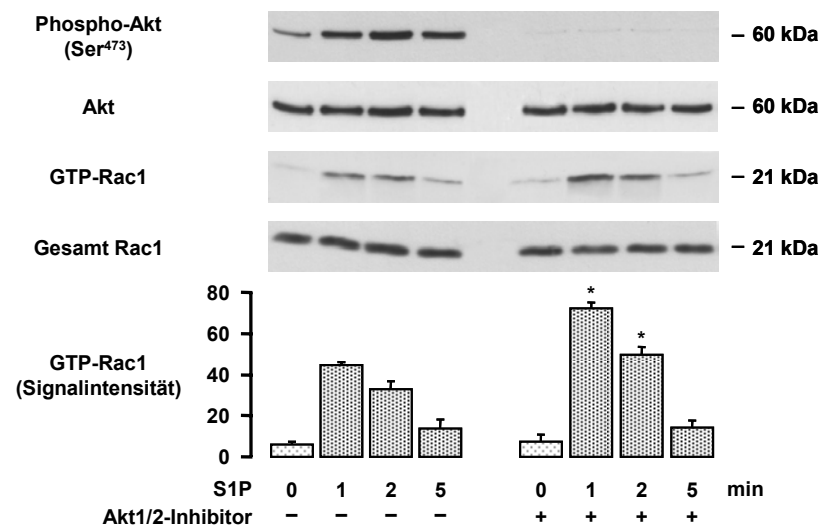


Abbildung 32: Einfluß der Inhibition von Akt1 auf die S1P-induzierte Rac1-Aktivierung

HUVEC wurden in 60-mm-Gewebekulturschalen ausgesät und drei Tage später für 5 h in wachstumsfaktorfreiem Medium inkubiert. In parallelen Schalen erfolgte eine 30minütige Vorinkubation mit dem Akt1/2-Inhibitor (20 μ M), anschließend die Zugabe von 1 μ M S1P für 1-5 min und dann die Lyse der Zellen. Zum Vergleich des Rac1-Gehaltes der verschiedenen Lysate und für die Immundetektion von Akt und Phospho-Akt wurden Proben mit je 10 μ g Gesamtproteingehalt im Western Blot untersucht. Zur Analyse der Rac1-Aktivierung wurde GTP-Rac1 mittels CRIB-GST und GSH-Sepharose aus Proben mit je 200 μ g Gesamtproteingehalt isoliert und ebenfalls im Western Blot untersucht. Für die Immundetektion wurden ein spezifischer Rac1-Antikörper, ein spezifischer Phospho-Akt-Antikörper (Ser473) und ein Gesamt-Akt-Antikörper verwendet. Die gezeigten Filmausschnitte sind repräsentativ für drei unabhängige Experimente. Das Diagramm zeigt die Daten der densitometrische Auswertung (Mittelwerte \pm SEM, n=3, *p<0,05).

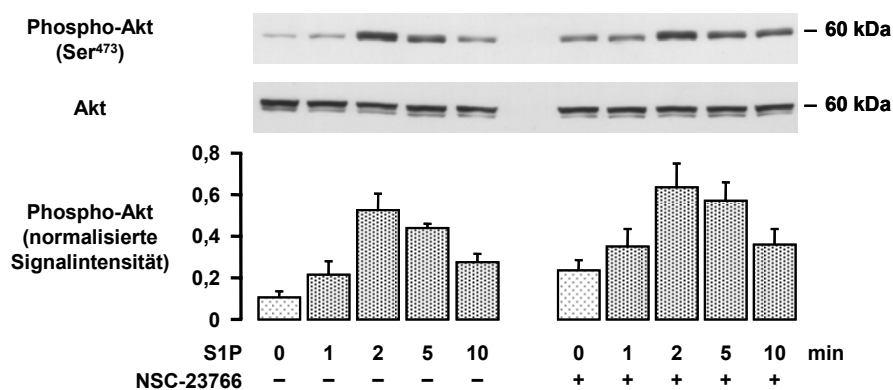


Abbildung 33: Einfluß der Inhibition von Rac1 auf die S1P-induzierte Akt-Aktivierung

HUVEC wurden in 60-mm-Gewebekulturschalen ausgesät und drei Tage später für 5 h in wachstumsfaktorfreiem Medium inkubiert, dem nach 1 h der Rac1-Inhibitor NSC-23766 (100 μ M) zugesetzt wurde. 4 h nach Inhibitorzusatz folgte die Zugabe von 1 μ M S1P für 1-10 min und dann die Lyse der Zellen. Zur Western-Blot-Analyse wurden Proben mit je 50 μ g Gesamtproteingehalt verwendet. Für die Immundetektion wurden zunächst spezifische Phospho-Akt-Antikörper (Ser473) verwendet und anschließend Gesamt-Akt-Antikörper für die Gegenfärbung. Die Normalisierung der Phospho-Akt-Densitometriewerte erfolgte gegen die entsprechenden Akt-Werte. Die gezeigten Filmausschnitte sind repräsentativ für vier unabhängige Experimente. Das Diagramm zeigt die densitometrische Analyse der Experimente (Mittelwerte \pm SEM, n=4).

3.6 S1P-induzierte Migration von Endothelzellen

S1P induziert über Bindung an seine Rezeptoren S1P₁ und S1P₃ die Migration von Endothelzellen, wobei vermutlich verschiedene Signalmoleküle (Rac1, PI3K/Akt/eNOS, ERK1/2) eine Rolle spielen (Kluk & Hla 2002). Die folgenden Untersuchungen wurden durchgeführt, um offene Fragen hinsichtlich des Beitrags der einzelnen Signalwege und der Isoform-spezifischen Charakterisierung der beteiligten PI3Ks zu klären. Die S1P-induzierte Migration wurde dabei in einem Transwell-Kammersystem gemessen.

3.6.1 Wirkung verschiedener PI3K-Inhibitoren

Abbildung 34A zeigt, daß die Migration nach S1P vollständig durch Pertussistoxin gehemmt wird und die Signaltransduktion damit ausschließlich über G_i-Proteine erfolgt. Wortmannin reduzierte die Zahl der migrierten Zellen um ca. 50 % (Abbildung 34B), was in Übereinstimmung mit der Literatur (Primo *et al.* 2007) auf eine wichtige Rolle von PI3Ks als signalübertragende Moleküle hinweist. Die Untersuchung der relevanten PI3K-Isoformen β und γ mit Hilfe Isoform-spezifischer Inhibitoren zeigte, daß beide Isoformen einen Anteil an der S1P-induzierten Migration haben. Sowohl der PI3K β -Inhibitor TGX-221 als auch der PI3K γ -Inhibitor AS-252424 verringerte die Zahl der migrierenden Zellen um etwa 30 % (Abbildung 34B). Bei der Kombination von TGX-221 und AS-252424 zeigte sich ein annähernd additiver Effekt, der vergleichbar mit dem von Wortmannin war (Abbildung 34B). Um mögliche, für die Vermittlung der Migration wichtige Effektoren der beiden PI3K-Isoformen zu identifizieren, wurden im folgenden Migrationsexperimente mit spezifischen Inhibitoren der in Frage kommenden Signalmoleküle durchgeführt.

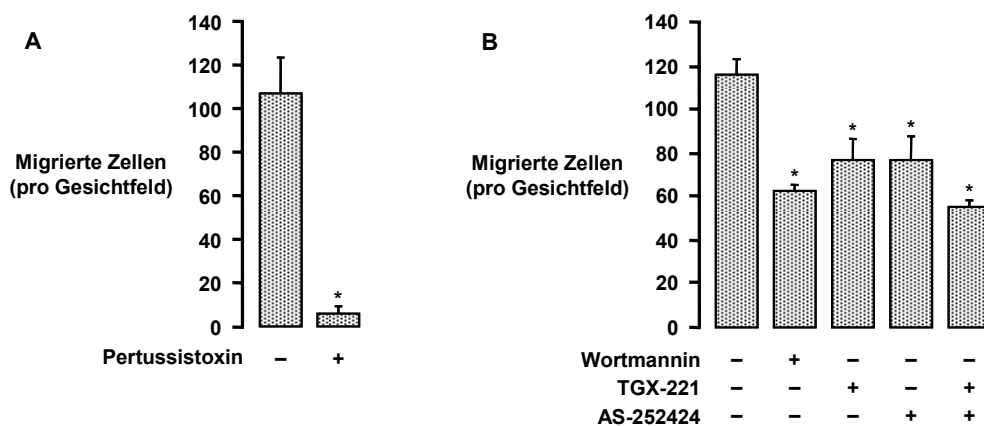


Abbildung 34: Effekt von G_i-Protein-Inhibition und PI3K-Inhibition auf die S1P-induzierte Migration

HUVEC wurden zur Untersuchung der Rolle von G_i-Proteinen für 3 h mit Pertussistoxin (500 ng/ml) vorinkubiert. Diese Zellen wurden danach parallel zu unbehandelten Zellen abgelöst, in wachstumsfaktorfreiem Medium resuspendiert und in Zellkultur-Inserts ausgesät, die in zugehörige 12-Well-Gebwebekulturschalen mit wachstumsfaktorfreiem Medium eingesetzt wurden. Die PI3K-Inhibitoren (0,1 μ M Wortmannin, 0,1 μ M TGX-221, 1 μ M AS-252424) und Pertussistoxin (500 ng/ml) wurden in oberen und unteren Kammern zugesetzt. Die Zugabe von 1 μ M S1P in die unteren Kammern erfolgte 30 min nach dem Zusetzen der PI3K-Inhibitoren oder insgesamt 3,5 h nach Zusatz von Pertussistoxin. Nach 4 h Stimulation mit S1P wurden die migrierten Zellen auf der Unterseite der Insert-Membranen mit Hämatoxylin gefärbt und gezählt. Die Diagramme zeigen die Mittelwerte der Differenzen von S1P-stimulierten und unstimulierten Zellen pro Gesichtsfeld (Mittelwerte \pm SEM, n=4, *p<0,05).

3.6.2 Wirkung von Akt-, eNOS-, Rac1- und MEK-Inhibitoren

Der spezifische Akt1/2-Inhibitor (Abbildung 32) wurde eingesetzt, um die Bedeutung der Kinase Akt1, die nach unseren Daten durch PI3K β aktiviert wird, als Vermittler der S1P-induzierten Migration zu untersuchen. Dieser Inhibitor reduzierte die Zahl der migrierenden Zellen um ca. 55 % (Abbildung 35A) und weist somit auf eine maßgebliche Funktion von Akt1 in der S1P-induzierten Migration von HUVEC hin.

Als möglicher Akt-Effektor bei der S1P-induzierten Migration wird eNOS/NO diskutiert (Dudzinski *et al.* 2006). Zur Untersuchung der Bedeutung von eNOS als Signalvermittler in unserem System wurde daher der eNOS-Inhibitor L-N^G-Nitroarginin-Methylester (L-NAME) eingesetzt. Die Hemmung der eNOS hatte jedoch keinen Einfluß auf die S1P-induzierte Migration (Abbildung 35B), was zeigt, daß NO für diese Antwort nicht erforderlich ist und Akt1 über andere Effektoren wirkt.

Wie im Kapitel 3.5 gezeigt, führt die Stimulation von HUVEC mit S1P zur Aktivierung von Rac1, was partiell durch PI3K β und PI3K γ vermittelt wird. Rac1 ist eine der Rho-GTPasen, denen eine wichtige Funktion bei der Migration von Zellen zugesprochen wird (Ridley 2006). Unsere Daten zeigen, daß die Verwendung eines spezifischen Rac1-Inhibitors (NSC-23766) im Transwell-Assay eine Hemmung der Migration von 72 % bewirkte (Abbildung 36) und damit Rac1 auch in der S1P-induzierten Migration von HUVEC eine wichtige Rolle innehat. Der Effekt der PI3K-Isoformen β und γ auf die Migration ist daher vermutlich zum Teil über die Aktivierung von Rac1 vermittelt.

Obwohl die Aktivierung der MAP-Kinasen ERK1/2 durch S1P unabhängig von PI3K β und PI3K γ verläuft, wurde untersucht, inwiefern ERK1/2 in die S1P-induzierte Migration von HUVEC involviert sind. Grundlage für diese Experimente sind Literaturdaten, die ERK1/2 eine entscheidende Rolle in der Vermittlung der Migration von Zellen zuschreiben (Huang *et al.* 2004). Es zeigte sich, daß die vollständige Hemmung der ERK1/2-Aktivierung durch den MEK1/2-Inhibitor PD-98059 die Migrationsantwort auf S1P um 49 % verringerte (Abbildung 37). Also haben ERK1/2 unabhängig von PI3K β oder γ einen wichtigen Anteil an der Migrationsantwort in S1P-stimulierten HUVEC.

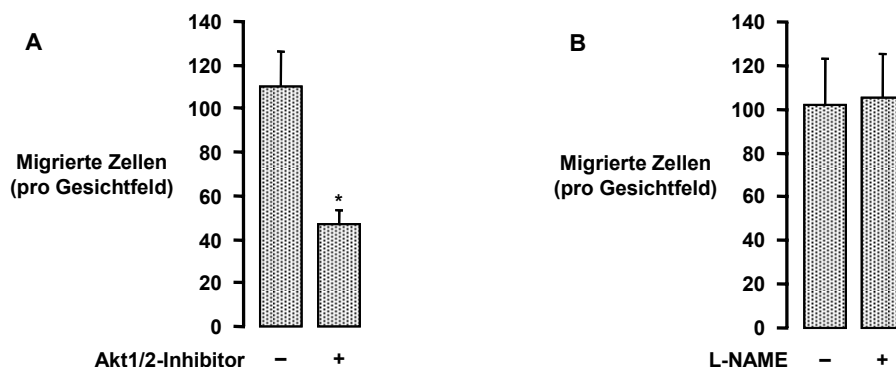


Abbildung 35: Die Rolle von Akt1 und eNOS in der S1P-induzierten Migration

HUVEC wurden in wachstumsfaktorfreiem Medium resuspendiert und in Zellkultur-Inserts ausgesät, die in zugehörige 12-Well-Gebwebekulturschalen mit wachstumsfaktorfreiem Medium eingesetzt wurden. Akt1/2-Inhibitor (20 μ M) oder L-NAME (1 mM) wurde in oberen und unteren Kammern zugesetzt. Die Zugabe von 1 μ M S1P in die unteren Kammern erfolgte 30 min nach dem Zusetzen der Inhibitoren. Nach 4 h Stimulation mit S1P wurden die migrierten Zellen auf der Unterseite der Insert-Membranen mit Hämatoxylin gefärbt und gezählt. Die Diagramme zeigen die Mittelwerte der Differenzen von S1P-stimulierten und unstimulierten Zellen pro Gesichtsfeld (Mittelwerte \pm SEM, n=5 (Akt1/2-Inhibitor), n=6 (L-NAME), *p<0,05).

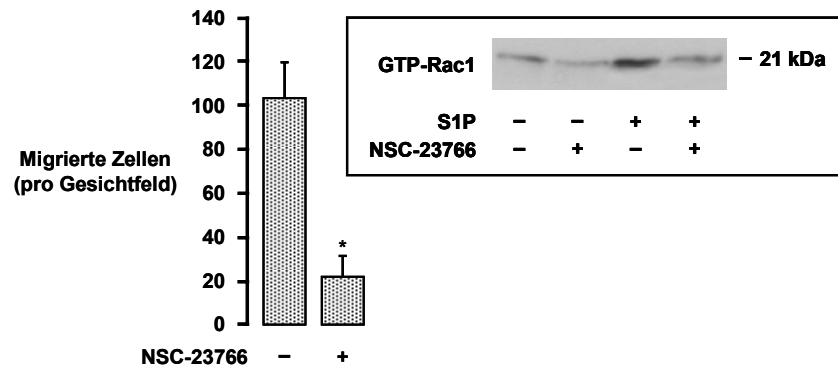


Abbildung 36: Die Rolle von Rac1 bei der S1P-induzierten Migration

HUVEC wurden für 4 h in Anwesenheit des Rac1-Inhibitors NSC-23766 (100 μ M) kultiviert, anschließend in wachstumsfaktorfreiem Medium resuspendiert und in Zellkultur-Inserts ausgesät, die in zugehörige 12-Well-Gewebekulturschalen mit wachstumsfaktorfreiem Medium eingesetzt wurden. NSC-23766 (100 μ M) wurde in oberen und unteren Kammern zugesetzt. Die Zugabe von 1 μ M S1P in die unteren Kammern erfolgte 30 min nach dem Zusetzen des Inhibitors. Nach 4 h Stimulation mit S1P wurden die migrierten Zellen auf der Unterseite der Insert-Membranen mit Hämatoxylin gefärbt und gezählt. Das Diagramm zeigt die Mittelwerte der Differenzen von S1P-stimulierten und unstimulierten Zellen pro Gesichtsfeld (Mittelwerte \pm SEM, $n=4$, $*p<0,05$). Das Insert zeigt den inhibitorischen Effekt von NSC-23766 auf die S1P-induzierte Rac1-Aktivierung. Dafür wurden HUVEC in 60-mm-Gewebekulturschalen ausgesät und drei Tage später für 5 h in wachstumsfaktorfreiem Medium inkubiert, dem nach 1 h NSC-23766 (100 μ M) zugesetzt wurde. 4 h nach Inhibitorzusatz folgte die Zugabe von 1 μ M S1P für 1 min und dann die Lyse der Zellen. Zur Analyse der Rac1-Aktivierung wurde GTP-Rac1 mittels CRIB-GST und GSH-Sepharose aus Proben mit je 200 μ g Gesamtproteingehalt isoliert und im Western Blot untersucht. Für die Immundetektion wurde ein spezifischer Rac1-Antikörper verwendet. Der gezeigte Filmausschnitt ist repräsentativ für drei unabhängige Experimente.

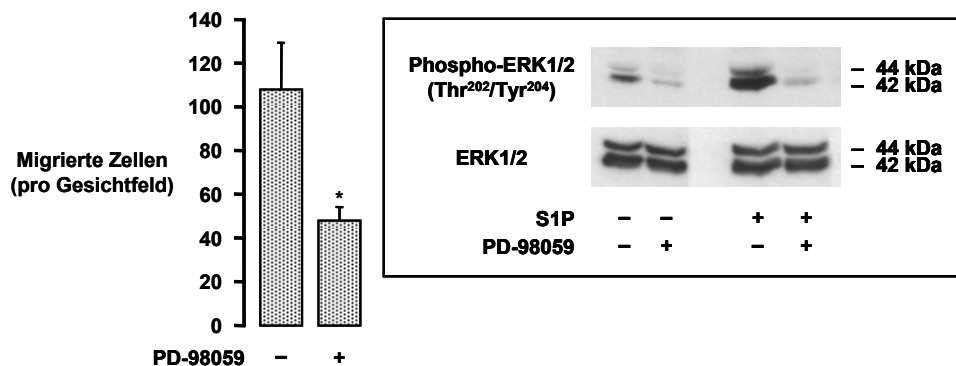


Abbildung 37: Effekt der ERK1/2-Inhibition auf die S1P-induzierte Migration

HUVEC wurden in wachstumsfaktorfreiem Medium resuspendiert und in Zellkultur-Inserts ausgesät, die in zugehörige 12-Well-Gewebekulturschalen mit wachstumsfaktorfreiem Medium eingesetzt wurden. Der MEK1/2-Inhibitor PD-98059 (10 μ M) wurde in oberen und unteren Kammern zugesetzt. Die Zugabe von 1 μ M S1P in die unteren Kammern erfolgte 30 min nach dem Zusetzen des Inhibitors. Nach 4 h Stimulation mit S1P wurden die migrierten Zellen auf der Unterseite der Insert-Membranen mit Hämatoxylin gefärbt und gezählt. Das Diagramm zeigt die Mittelwerte der Differenzen von S1P-stimulierten und unstimulierten Zellen pro Gesichtsfeld (Mittelwerte \pm SEM, $n=4$, $*p<0,05$). Das Insert zeigt den inhibitorischen Effekt von PD-98059 auf die S1P-induzierte Phosphorylierung von ERK1/2. Dafür wurden HUVEC in 60-mm-Gewebekulturschalen ausgesät und drei Tage später für 5 h in wachstumsfaktorfreiem Medium inkubiert. In parallelen Schalen erfolgte eine 30minütige Vorinkubation mit PD-98059 (10 μ M), anschließend die Zugabe von 1 μ M S1P für 2 min und dann die Lyse der Zellen. Zur Western-Blot-Analyse wurden Proben mit je 50 μ g Gesamtproteingehalt verwendet. Für die Immundetektion wurden zunächst spezifische Phospho-ERK1/2-Antikörper verwendet und anschließend Gesamt-ERK1/2-Antikörper für die Gegenfärbung. Die gezeigten Filmausschnitte sind repräsentativ für drei unabhängige Experimente.

4 Diskussion

4.1 RNA-Interferenz-Methode

Im Laufe der letzten fünf Jahre wurde die RNA-Interferenz-Methode als bedeutsames Werkzeug zur Untersuchung der Funktion von Proteinen in Säugerzellen etabliert (Scherr & Eder 2007) und auch in unserer Arbeit eingesetzt. Dabei war ein grundlegender Punkt, zunächst eine geeignete siRNA-Sequenz zur Downregulation von p110 γ zu definieren. Wichtig war dabei, eine hohe Effizienz und Spezifität der verwendeten siRNA zu erreichen.

Die Auswahl der siRNA erfolgte nach bestimmten in der Literatur veröffentlichten Kriterien. Um unspezifische Effekte der verwendeten siRNAs zu vermeiden, müssen eine Reihe von Rahmenbedingungen beachtet werden. So sollte die siRNA nicht länger als 23 Basenpaare sein, da sonst abhängig vom Zelltyp eine Interferonantwort ausgelöst wird, die den apoptotischen Zelltod auslöst (Reynolds *et al.* 2006). Des Weiteren sollen bestimmte Teilsequenzen wie „UGGC“ im Führungsstrang der siRNA vermieden werden, da sie als toxisch charakterisiert wurden (Fedorov *et al.* 2006). Außerdem soll eine Methylierung der 2'-OH-Gruppe der Ribosereste von Nukleotid 1 und 2 des Führungsstranges und von Nukleotid 2 des Passagierstranges zu einer deutlichen Reduzierung der unspezifischen siRNA-Effekte führen (Jackson *et al.* 2006). Die in unserer Arbeit verwendeten p110 γ -siRNAs haben eine Länge von 19 Basenpaaren mit 3'-TT-Überhang. Die anderen genannten Kriterien konnten nicht aktiv berücksichtigt werden, da sie zum Zeitpunkt des p110 γ -siRNA-Screenings noch nicht veröffentlicht waren. Allerdings hat die letztlich von uns für Experimente ausgewählte p110 γ -siRNA keine „UGGC“-Teilsequenz.

Zur Suche effizienter siRNAs standen anhand der dazu erstellten Veröffentlichungen bestimmte Programme zur Verfügung (Hsieh *et al.* 2004; Reynolds *et al.* 2004; Ui-Tei *et al.* 2004; Yuan *et al.* 2004). Die von uns anfangs zur Detektion von geeigneten p110 γ -siRNA-Sequenzen verwendete Suchmaschine des Whitehead Institutes (Yuan *et al.* 2004) basierte auf den Anfangsarbeiten der siRNA-Forschung (Elbashir *et al.* 2001a; Elbashir *et al.* 2001b). Aus heutiger Sicht verfügte sie über einen unzureichenden Suchalgorithmus. Es ist es daher nicht verwunderlich, daß die mit dieser Software erhaltenen ersten vier p110 γ -siRNA-Sequenzen (#1 – #4) eine geringe Knockdowneffizienz hatten. Dagegen erwies sich die mittels der Dharmacon-Suchmaschine nach den Kriterien von Reynolds und Mitarbeitern (Reynolds *et al.* 2004) ermittelte p110 γ -siRNA „D3g“ als sehr effektiv.

In einer aktuellen Veröffentlichung von Matveeva und Mitarbeitern werden alle wichtigen Suchalgorithmen hinsichtlich ihrer Vorhersagekraft verglichen und ein neuer Algorithmus konzipiert (Matveeva *et al.* 2007). Die entsprechende Software „siRNA Scales“ wurde online bereit gestellt (http://gesteland.genetics.utah.edu/siRNA_scales/). Sie ermöglicht auch die Beurteilung fertiger siRNA-Sequenzen. Die mit „siRNA Scales“ erhaltenen Werte für „D3g“ stimmen gut mit den tatsächlich gemessenen überein (vorhergesagt: 96 % Knockdown, gemessen: 90 %) (Abbildung 8). Die Sequenz „D3g“ ist daher auch aus heutiger Sicht eine sehr gute Wahl. Laut „siRNA Scales“ hat „D3g“ an 12 der 15 wichtigen Positionen ein günstiges Basenpaar (fettgedruckt) und an einer Position ein ungünstiges (unterstrichen) (Antisense-Sequenz: 5'-U**AAAUAGCUUAGG**-**AUAUGCTT**-3'). Dazu kommt, daß es bei „D3g“ ausgeprägte Unterschiede in der thermodynamischen Stabilität der beiden siRNA-Duplex-Enden gibt. Das siRNA-Duplex-Ende, das das 5'-Ende des Antisense-Stranges enthält, ist wesentlich weniger stabil als das andere Ende und kann dadurch leichter entwunden werden, wodurch es

überwiegend zur Verwendung des Antisense-Stranges als Führungsstrang kommt. Dagegen hat die p110 γ -siRNA-Sequenz #2, die beste der mit der Suchmaschine des Whitehead Institutes gefundene Sequenz, an 8 Positionen ein günstiges und an 2 Positionen ein ungünstiges Basenpaar (Antisense-Sequenz: 5'-GCUUCCUUGGUCUUC-UCCCTT-3') und zeigt keine Unterschiede in der thermodynamischen Stabilität der beiden siRNA-Duplex-Enden. Laut „siRNA Scales“ wird für die p110 γ -siRNAs #1 bis #4 trotzdem eine Knockdowneffizienz von 60 bis 70 % angegeben, während in unseren Experimenten nur 0-46 % gemessen wurden (Abbildung 4). Es kann also zu Abweichungen zwischen vorausgesagten und tatsächlichen Effizienzen kommen.

Während eine effiziente p110 γ -siRNA-Sequenz in unserer Arbeit erst gefunden werden mußte, konnten wir für p110 β auf eine validierte Sequenz zurückgreifen. In diesem Fall waren Effizienz und unspezifische Knockdown-Effekte bereits durch den Hersteller unter Verwendung von DNA-Microarrays validiert. Das Gleiche gilt auch für die Kontroll-siRNA. Selbst wenn DNA-Microarrays nicht alle unspezifischen Effekte von siRNAs detektieren können (Couzin 2004), ist es besser, derart validierte siRNA zu verwenden, als die Kontroll-siRNA-Sequenz selbst zu entwerfen und sich auf die Ergebnisse einer BLASTn-Analyse zu verlassen (Snøve & Holen 2004).

Ein wichtiger Punkt bei Einsatz der RNAi-Methode ist die Auswahl der Transfektionsmethode für die gewählten siRNAs. In unseren Versuchen wurden Elektroporation und Lipofektion getestet. Die Elektroporation führte unter den angegebenen Bedingungen (siehe Kapitel 2.2.2.2) allerdings zu relativ hoher Zytotoxizität und stark schwankenden Knockdown-Effekten und wurde daher nur zu Beginn der RNAi-Versuche verwendet. Für die Lipofektion wurde in unserer Arbeit das Transfektionsmittel „SAINT-MIX“ und später „SAINT-RED“ eingesetzt. Gerade bei Experimenten mit primären Zellen (HUVEC) ist die Wahl des Transfektionsmittels besonders wichtig. Für das häufig verwendete „Lipofectamine™ 2000“ wurde beispielsweise eine deutliche Zytotoxizität nachgewiesen (Spagnou *et al.* 2004; Nguyen *et al.* 2007). Im Gegensatz dazu ist „SAINT-MIX“ im Wesentlichen nicht-toxisch (van der Woude *et al.* 1997; Shi *et al.* 2001). „SAINT-MIX“ wurde ursprünglich für die Transfektion von DNA entwickelt und von uns nach Empfehlungen des Herstellers auch für siRNA eingesetzt. Um den unterschiedlichen biochemischen Eigenschaften der RNA im Vergleich zu DNA gerecht zu werden (Spagnou *et al.* 2004), optimierten die Hersteller später das Reagenz „SAINT-MIX“ für die siRNA-Transfektion zu „SAINT-RED“. „SAINT-MIX“ wurde daraufhin in den RNAi-Versuchen dieser Arbeit durch „SAINT-RED“ ersetzt, sobald es kommerziell erhältlich war. Die Knockdowneffizienz, die mit beiden Reagenzien erzielt wurde, war allerdings vergleichbar (Daten nicht gezeigt).

Die von uns verwendeten siRNAs zur Downregulation von p110 β und p110 γ wurden in einer Menge von 1 μ g/Well einer 6-Well-Gewebekulturplatte (0,1 μ g/cm², 70 nM) eingesetzt. Typischerweise variieren die in der Literatur angegebenen Konzentrationen zwischen 20 und 200 nM. Unspezifische Effekte treten dabei in Abhängigkeit von der siRNA-Konzentration auf (Persengiev *et al.* 2004; Lin *et al.* 2005). Die übliche nanomolare Angabe der siRNA-Konzentration wurde in der vorliegenden Arbeit nicht verwendet, da bei Lipofektion die gebildeten Lipoplexe aus der Transfektionslösung auf die Zellen präzipitieren und letztlich die Menge siRNA pro Well-Fläche ausschlaggebend ist (Smisterova *et al.* 2001). Die von uns verwendete siRNA-Menge ist vergleichbar mit der von Spagnou und Mitarbeitern empfohlenen Menge von 0,1 μ g/Well der 48-Well-Gewebekulturplatte (0,09 μ g/cm²) (Spagnou *et al.* 2004). Letztlich können wir unspezifische Effekte der verwendeten siRNA-Menge aber nicht vollständig ausschließen, da hierzu Proteom-Analysen durchgeführt werden müßten (Jackson & Linsley 2004). Allerdings wird die Relevanz unserer siRNA-Ergebnisse durch die

Ergebnisse, die wir mit spezifischen chemischen Inhibitoren erhielten, unterstrichen (und umgekehrt).

In unseren Experimenten erwies sich eine Einwirkzeit der siRNA von 72 h als optimal, während eine Verlängerung bis auf 96 h wieder zu einem leichten Anstieg der Proteinexpression führte. Eine Inkubationszeit von 72 h wird auch in aktuellen Arbeiten zur siRNA-vermittelten Downregulation von p110 β (An *et al.* 2007) und p110 γ (Li *et al.* 2006) genutzt. Gewöhnlich verringert eine siRNA-Behandlung die Menge der entsprechenden Ziel-mRNA in Säugerzellen innerhalb von 24-48 h (Bonetta 2004). Nach Einstellung eines Gleichgewichts zwischen mRNA-Abbau durch RNAi und mRNA-Synthese bestimmt die Halbwertszeit des Zielproteins, wann dessen neue Konzentration erreicht ist. Nach 7facher Halbwertszeit im Anschluß an das Erreichen des mRNA-Knockdown-Gleichgewichts sinkt der Anteil der Ausgangsproteinmenge auf unter 1 % und fällt somit nicht mehr ins Gewicht. Für das Protein Luziferase mit einer Halbwertszeit in Säugerzellen von ca. 3 h (Thompson *et al.* 1991) wurde das Knockdown-Maximum zwei Tage nach der Transfektion erreicht (Bartlett & Davis 2006; Takahashi *et al.* 2006). Weder für p110 β noch für p110 γ sind genaue Halbwertszeiten bekannt und eine rechnerische Ermittlung des maximalen Knockdowns ist schwer möglich. Für p110 α wurde im Komplex mit p85 eine Halbwertszeit von ca. 7 h bestimmt (Brachmann *et al.* 2005). Damit wäre ein p110 α -Knockdown-Maximum am dritten Tag nach der Transfektion, also nach 72 h, erreichbar. Eine deutliche Reduzierung der p110 α -Proteinmenge wurde aber nicht nur am dritten Tag (Czuderna *et al.* 2003a), sondern auch schon am zweiten Tag gefunden (Brachmann *et al.* 2005). Möglicherweise waren auch die Downregulation von p110 β oder p110 γ nach 48 h entsprechend ausgeprägt, was aber in unseren Experimenten nicht getestet wurde.

Der relativ langanhaltende Knockdown (mindestens fünf Tage) der p110 γ (Abbildung 7) ist vermutlich auf die geringe Verdünnung der siRNA durch Zellteilung zurück zu führen. Zum Zeitpunkt der Transfektion waren unsere Zellen ca. 60 % konfluent. Bis zur Kontaktinhibition der Proliferation der HUVEC beim Erreichen der Konfluenz können sie sich daher im Schnitt nur noch einmal teilen (Verdünnung der siRNA von nur 1:2). Während der RNAi-Effekt in schnell wachsenden Tumorzelllinien sein Maximum bei zwei bis drei Tagen hat und nach ca. einer Woche wieder verschwindet, kann er in Zellen, die sich nicht mehr teilen, bis zu drei Wochen anhalten. Die Abschwächung der Effekte ist dann auf die begrenzte Stabilität der siRNA zurückzuführen (Bartlett & Davis 2006). In ähnlicher Weise ist vermutlich die Stabilität der siRNA ein begrenzender Faktor für die von uns beobachtete Abschwächung der Effekte bei Inkubationszeiten > 5 Tagen.

Zur quantitativen Analyse des PI3K-Knockdowns wurde nicht die mRNA sondern die PI3K-Proteinexpression verglichen, um gegebenenfalls funktionelle Konsequenzen beurteilen zu können. Im Fall der p110 γ war dies problemlos mittels Western Blot möglich. Die kommerziell erhältlichen Antikörper für p110 β waren jedoch nicht für die Quantifizierung im Western Blot von Zell-Lysaten geeignet. Lediglich mit dem Antikörper „sc-602“ konnte man das Verschwinden einer schwach sichtbaren Bande direkt über einer starken Bande im Bereich von 110 kDa erkennen. Anfängliche Zweifel, ob es sich dabei tatsächlich um p110 β handelt, konnten durch RT-PCR und Immunpräzipitation von p110 β ausgeräumt werden. Ein ähnliches p110 β -Antikörper-Problem wurde von Murga und Mitarbeitern beschrieben (Murga *et al.* 2000).

Zusammenfassend kann man sagen, daß die von uns selektierte p110 γ -siRNA und die kommerziell verfügbare p110 β -siRNA bei in einer Menge von 1 μ g/30-mm-Well, einer Inkubationszeit von 72 h und unter Verwendung der „SAINT-RED“-vermittelten Transfektion zu einer deutlichen Verringerung der jeweiligen PI3K-Proteinexpression führten

(90 % im Zell-Lysat bei p100 γ und 70 % im Immunpräzipitat bei p110 β) und daher in weiterführenden Experimenten zur Untersuchung der PI3K-Isoformen eingesetzt werden konnten.

4.2 S1P-induzierte Akt-Phosphorylierung in HUVEC

Unsere Daten zeigen, daß die Stimulation von HUVEC mit S1P zu einer transienten Zunahme der Phosphorylierung von Akt am Ser473 führt. Das Phosphorylierungssignal ist nach 30 s nachweisbar, hat sein Maximum bei 2 min und ist nach 5 min bereits wieder auf den 30-s-Wert gesunken. Damit zeigen wir eine andere Kinetik der Akt-Aktivierung als in Versuchen an BAEC nach S1P-Stimulierung beschrieben wurde. Das Maximum der S1P-induzierten Ser473-Phosphorylierung lag dort im Bereich von 5 bis 10 min (Igarashi *et al.* 2001; Rikitake *et al.* 2002). Generell scheinen BAEC im Vergleich zu HUVEC Unterschiede in den Signalwegen aufzuweisen, was die Übertragung der Ergebnisse auf menschliche Zellen erschwert. Interessanterweise war die Phosphorylierung von Akt vollständig durch Vorinkubation der Zellen mit einem Akt1/2-Inhibitor gehemmt. Da in HUVEC nur die Akt-Isoformen Akt1 und Akt3 exprimiert werden (Fieber *et al.* 2006), läßt sich aus diesem Ergebnis ableiten, daß S1P zur Aktivierung von Akt1 führt.

Unsere Untersuchungen zeigen, daß die S1P-induzierte Phosphorylierung von Akt in HUVEC nicht auf einer Transaktivierung des EGFR (Kim *et al.* 2000) oder VEGFR (Endo *et al.* 2002; Tanimoto *et al.* 2002) beruht. Weder die Hemmung von VEGFR2 durch SU5614 noch die Inhibition von EGFR durch AG1478 waren in der Lage, die Akt-Phosphorylierung nach S1P zu beeinflussen. Darüber hinaus hatte auch Genistein, ein allgemeiner Tyrosinkinase-Inhibitor keinen nennenswerten Effekt, so daß vermutet werden kann, daß Tyrosinkinasen generell nicht für die S1P-induzierte Akt-Phosphorylierung in HUVEC von Bedeutung sind. Die fehlende Wirkung des EGFR-Inhibitors stimmt mit den Ergebnissen anderer Arbeiten in HUVEC (Endo *et al.* 2002) und BAEC (Tanimoto *et al.* 2002) überein, die keine EGFR-Transaktivierung durch S1P nachweisen konnten.

Die S1P-induzierte Phosphorylierung von Akt wurde in unseren Experimenten durch Pertussistoxin und Wortmannin blockiert. Pertussistoxin bewirkt über eine ADP-Ribosylierung der α -Untereinheiten der G $_i$ -Proteine deren Inaktivierung und Wortmannin ist ein genereller PI3K-Inhibitor. Aus unseren Daten kann daher geschlußfolgert werden, daß die durch S1P $_1$ und S1P $_3$ aktivierten G $_i$ -Proteine (Windh *et al.* 1999) und PI3K-Aktivität für die S1P-induzierte Akt-Phosphorylierung essentiell sind. Zu dem gleichen Ergebnis kommen Untersuchungen in BAEC (Igarashi *et al.* 2001). Unsere Ergebnisse zeigen darüber hinaus anhand unterschiedlicher experimenteller Zugänge, daß die für die Akt-Aktivierung verantwortlich PI3K-Isoform die PI3K β ist. Eine Aktivierung der PI3K β durch S1P war in einer früheren Arbeit in BAEC bereits gezeigt worden, wobei diese Zellen keine PI3K γ exprimieren (Igarashi & Michel 2001). In unserer Arbeit führte der PI3K β -spezifische Inhibitor TGX-221 konzentrationsabhängig zu einer signifikanten Inhibition der Akt-Phosphorylierung. Diese war ab einer Konzentration von 50 nM nachweisbar und bei 1 μ M sowohl unter basalen Bedingungen als auch nach S1P-Stimulierung nahezu vollständig ausgeprägt. Die Hemmung der Akt-Phosphorylierung durch TGX-221 war außerdem während des gesamten Zeitraums der S1P-Stimulierung (30 s, 2, 5, 10 min) vorhanden. Neben dem spezifischen PI3K β -Inhibitor wurde die RNAi-Methode gewählt, um die Rolle der PI3K β zu untersuchen. Mit Hilfe spezifischer siRNA wurde die katalytische Untereinheit der PI3K β um 70 % herunterreguliert. Parallel dazu und in Übereinstimmung mit den TGX-221-Daten wurde eine signifikante

Inhibition der S1P-stimulierten Akt-Phosphorylierung nachgewiesen, so daß sich die Bedeutung der PI3K β als verantwortliches Enzym bestätigte. Das Expressionsniveau von Akt blieb in unseren Versuchen unverändert. Unsere Ergebnisse befinden sich im Einklang mit Befunden aus HeLa-Zellen, wo der Knockdown von p110 β die Serum-induzierte Akt-Phosphorylierung hemmt, ohne Akt herunterzuregulieren (Czauderna *et al.* 2003a). Im Gegensatz dazu führte ein p110 β -Knockdown in humanen Adenokarzinomzellen (HEC-1B) nicht nur zu einer Hemmung der Akt-Phosphorylierung, sondern auch zu einer Verringerung der Akt-Expression (An *et al.* 2007).

Unsere Daten zeigen auch, daß PI3K γ nicht an der S1P-induzierten Akt-Phosphorylierung beteiligt ist. Weder der PI3K γ -spezifische Inhibitor AS-252424 (1 μ M) noch die siRNA-vermittelte Downregulation von p110 γ um ca. 90 % hatten einen Einfluß auf die basale oder S1P-induzierte Phosphorylierung von Akt. Weiterhin konnten wir zeigen, daß auch der PI3K δ -spezifische Inhibitor IC87114 (1 μ M) die Phosphorylierung von Akt durch S1P nicht beeinflußt und damit eine Rolle von PI3K δ ausschließen. Dieser Befund steht im Einklang mit dem fehlenden Effekt von Tyrosinkinase-Inhibitoren in unserem System, da PI3K δ durch Rezeptortyrosinkinasen stimuliert wird (Maier *et al.* 1999; Murga *et al.* 2000). Auch PI3K α wird über Rezeptortyrosinkinase-abhängige Signalwege aktiviert und hat daher vermutlich keinen Einfluß auf die durch S1P ausgelöste Akt-Phosphorylierung. Unterstützt wird diese Aussage durch Ergebnisse in HeLa-Zellen, in denen der Knockdown von p110 α die Akt-Phosphorylierung nicht veränderte (Czauderna *et al.* 2003a; Czauderna *et al.* 2003b). Neuere Arbeiten zeigen allerdings, daß in bestimmten Zellen eventuell auch die PI3K α durch S1P aktiviert werden kann. So wurde in humanen Lungenendothelzellen nachgewiesen, daß S1P-Stimulation zu einer Anreicherung von S1P $_1$, S1P $_3$, PI3K α (Lipidkinase aktiv), PI3K β (Lipidkinase inaktiv) und phosphoryliertem Akt in den caveolinreichen Mikrodomänen der Zellmembran führt (Singleton *et al.* 2005; Dudek *et al.* 2007). In diesen Zellen ist somit möglicherweise nicht PI3K β sondern PI3K α für die S1P-induzierte Akt-Phosphorylierung zuständig. In unserem System deuten jedoch alle Ergebnisse auf eine alleinige Rolle der PI3K β bei der S1P-induzierten Aktivierung von Akt.

Eine wichtige Rolle bei Aktivierung und Funktion von PI3Ks spielt die Translokation in substratreiche Regionen der Plasmamembran (Hawkins *et al.* 2006). Für die PI3K β wurde gezeigt, daß die von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren freigesetzten G $\beta\gamma$ -Untereinheiten für eine Translokation zur Membran und Aktivierung der Lipidkinase ausreichen, wobei die regulatorische Untereinheit p85 keine Rolle spielt (Murga *et al.* 2000). Im Gegensatz dazu benötigt die PI3K γ eine ihrer regulatorische Untereinheiten, p101 oder p87^{PIKAP}, für die Bindung an die membranständigen G $\beta\gamma$ -Untereinheiten und die Aktivierung der katalytischen Untereinheit p110 γ (Brock *et al.* 2003; Voigt *et al.* 2006). Eine Aktivierung der Lipidkinaseaktivität von p110 γ durch G $\beta\gamma$ -Untereinheiten ohne p101 ist zwar möglich, wie *in-vitro*-Untersuchungen zeigen, das bevorzugte Substrat ist dann aber PtdIns, so daß PtdIns3P an Stelle von PIP $_3$ produziert wird (Maier *et al.* 1999).

Unsere Daten zeigen, daß die regulatorischen Untereinheiten der PI3K γ , p101 und p87^{PIKAP}, in HUVEC nicht exprimiert sind und lassen vermuten, daß die PI3K γ -Isoform unter diesen Bedingungen keine signifikante Lipidkinaseaktivität entfalten kann. In diesem Fall würde PI3K γ nicht zur Produktion von PIP $_3$ mit nachfolgender Akt-Rekrutierung und -Aktivierung beitragen können. Passend dazu wurde in humanen Lungenendothelzellen gezeigt, daß die Stimulation mit S1P zur Membranrekrutierung von PI3K α und PI3K β aber nicht von PI3K γ führt (Singleton *et al.* 2005). Weitere Untersuchungen müssen klären, ob die S1P-induzierte Akt-Aktivierung tatsächlich mit PIP $_3$ -Produktion korreliert und eine PI3K-Isoform-spezifische Akt-Aktivierung auch bei Einsatz anderer G-Protein-gekoppelter Agonisten beobachtet werden kann. Da PI3K γ

(ebenso auch PI3K α und PI3K δ) aber nicht PI3K β durch Bindung von GTP-Ras aktiviert werden kann (Rodriguez-Viciano *et al.* 2004), sollte in weiterführenden Experimenten auch dieser Signalweg untersucht werden.

Die Stimulation von HUVEC mit S1P führt also über G $_i$ -Proteine und PI3K β zur Aktivierung von Akt, ohne daß eine Transaktivierung von Rezeptortyrosinkinasen eine Rolle spielt. Die überraschenderweise fehlende Funktion der PI3K γ als Vermittler der Akt-Phosphorylierung in HUVEC erklärt sich möglicherweise durch Fehlen der für die Substratspezifität nötigen regulatorischen Untereinheiten.

4.3 S1P-induzierte eNOS-Phosphorylierung in HUVEC

Unsere Daten zeigen, daß S1P-Stimulierung von HUVEC auch zu einer zeitabhängigen Phosphorylierung der eNOS am Serinrest 1177 führt. Das Signal erreicht das Maximum dabei bereits innerhalb von 15 s, bleibt bis zu 1 min konstant und sinkt nach 5 min etwa um die Hälfte ab. Auch hier zeigen sich im Vergleich mit Literaturbefunden wieder deutliche zelltypabhängige Unterschiede. In BAEC ist eine Zunahme der eNOS-Phosphorylierung erst nach 1 min dektectierbar und das Maximum wird erst nach 5 min erreicht (Rikitake *et al.* 2002; Tanimoto *et al.* 2002). Dabei korrelieren Akt- und eNOS-Phosphorylierung in BAEC, während die eNOS-Phosphorylierung der Akt-Phosphorylierung in HUVEC deutlich vorausgeht. Letzteres ist als Hinweis darauf zu betrachten, daß die S1P-induzierte eNOS-Phosphorylierung nicht ausschließlich über Akt erfolgt.

Um den Anteil des PI3K β /Akt-Signalweges an der S1P-induzierten eNOS-Phosphorylierung zu ermitteln, wurde der PI3K β -Inhibitor TGX-221 eingesetzt. TGX-221 bewirkte eine Inhibition der durch S1P (1 μ M, 2 min) hervorgerufenen eNOS-Phosphorylierung, die 34 % jedoch nicht überschritt, obwohl unter den gleichen Bedingungen die S1P-induzierte Akt-Phosphorylierung vollständig gehemmt war. Somit kann vermutet werden, daß zum untersuchten Zeitpunkt (2 min) der PI3K β /Akt-Signalweg für ca. ein Drittel der S1P-induzierten eNOS-Phosphorylierung verantwortlich ist. Der Anteil der PI3K β /Akt-abhängigen (TGX-221-sensitiven) eNOS-Phosphorylierung nimmt im zeitlichen Verlauf nach S1P-Stimulierung von anfänglichen 11 % bei 15 s auf 44 % bei 10 min zu, während die Bedeutung des TGX-221-unabhängigen Prozesses abnimmt. Ein ähnlicher Effekt wurde nach Stimulation von HUVEC mit VEGF beobachtet, wo es zu einer frühen (0-2 min) PI3K/Akt-unabhängigen und einer späteren (5-30 min) PI3K/Akt-abhängigen eNOS-Aktivierung kommt (Brouet *et al.* 2001). Dabei war die erste Phase der eNOS-Aktivierung calciumabhängig. Die Akt-unabhängige eNOS-Phosphorylierung wird möglicherweise durch die calciumabhängige CaMKII vermittelt, die in Endothelzellen auch für die Bradykinin-induzierte eNOS-Phosphorylierung verantwortlich ist (Fleming *et al.* 2001).

Unsere Experimente zeigen, daß eine Inkubation von HUVEC mit dem Calcium-Chelator BAPTA-AM zu einer Hemmung der basalen und S1P-induzierten eNOS-Phosphorylierung am Serinrest 1177 führte und bestätigen damit die Calciumabhängigkeit des Prozesses. Allerdings war die Hemmung durch BAPTA-AM zu allen Zeitpunkten nach S1P-Zusatz zu sehen, was vermuten läßt, daß sowohl die Akt-unabhängige als auch die Akt-abhängige eNOS-Phosphorylierung calciumabhängig sind. In Übereinstimmung damit konnten wir zeigen, daß auch die Phosphorylierung von Akt durch BAPTA-AM stark reduziert wird, was auf eine Rolle von Calcium in der Vermittlung der Akt-Aktivierung schließen läßt. Eine ähnliche Beobachtung wurde in einer früheren Arbeit gemacht, die zeigen konnte, daß die S1P-induzierte Phosphorylierung von Akt und eNOS in BAEC calciumabhängig ist (Igarashi *et al.* 2001). In dieser Studie wurde weiterhin gezeigt, daß die Lipidkinaseaktivität der für die Akt-Aktivierung zuständigen PI3K β

Calcium-Chelator-sensitiv ist (Igarashi & Michel 2001). Die Calciumabhängigkeit der S1P-induzierten Akt-Phosphorylierung in unserer Arbeit ist daher möglicherweise ebenfalls auf die Calciumabhängigkeit der PI3K β zurückzuführen. Calcium kann auf verschiedene Weise eine Rolle bei der PI3K-Aktivierung spielen. So wurde gezeigt, daß CaM an die regulatorische Untereinheit von Klasse-IA-PI3Ks binden kann und diese dadurch aktiviert (Joyal *et al.* 1997; Pérez-García *et al.* 2004; Xu *et al.* 2007). Weiterhin wurde gezeigt, daß Klasse-I-PI3Ks durch PKC β_{II} (Campbell & Trimble 2005) oder CaMKII (Ma *et al.* 2007) aktiviert werden können.

Unsere Daten zeigen also, daß die S1P-induzierte eNOS-Phosphorylierung ein weitgehend calciumabhängiger Prozeß ist. Ein schneller Calciumeinstrom nach Stimulation der Zellen mit S1P (Itagaki *et al.* 2007) könnte zur Aktivierung der CaMKII führen (Hudmon & Schulman 2002), die innerhalb weniger Sekunden zur Ser1177-Phosphorylierung der eNOS führt. Calcium könnte weiterhin die G $\beta\gamma$ -induzierte Aktivierung der PI3K β über die oben diskutierten Signalwege fördern. Die zeitlich verzögerte PIP₃-Produktion durch PI3K β führt dann zur Rekrutierung von Akt, PDK-1 und der Ser473-Kinase, wodurch Akt aktiviert wird und eine zunehmende Rolle bei der weiteren eNOS-Phosphorylierung spielt.

Um ein Maß für die S1P-induzierte eNOS-Aktivität zu erhalten, wurden in unserer Studie cGMP-Messungen durchgeführt. cGMP entsteht nach Aktivierung der löslichen Guanylatzyklase durch NO und ist somit ein Maß für die biologische Aktivität von NO. Unsere Daten zeigen eine vergleichsweise moderate Induktion der cGMP-Produktion nach Stimulation der Zellen mit S1P. Vergleichssubstanzen wie VEGF und Thrombin führten zu einer 5-10fach höheren cGMP-Produktion. Aus diesen Daten schließen wir, daß S1P unter unseren Bedingungen nur ein schwacher Stimulus der NO-Bildung ist. Die eNOS als Akt-Zielprotein im S1P/PI3K/Akt-Signalweg spielt daher möglicherweise nur eine geringere Rolle. In Übereinstimmung damit wurde gezeigt, daß die S1P-induzierte eNOS-Aktivität keine oder geringe Bedeutung für die Vermittlung der S1P-induzierten Migration hat und keine Rolle in der S1P-induzierten Proliferation spielt (Morales-Ruiz *et al.* 2001)

Abbildung 38 zeigt eine modellhafte Übersicht für Signalprozesse, die für die S1P-induzierte Aktivierung von Akt und eNOS in HUVEC verantwortlich sind.

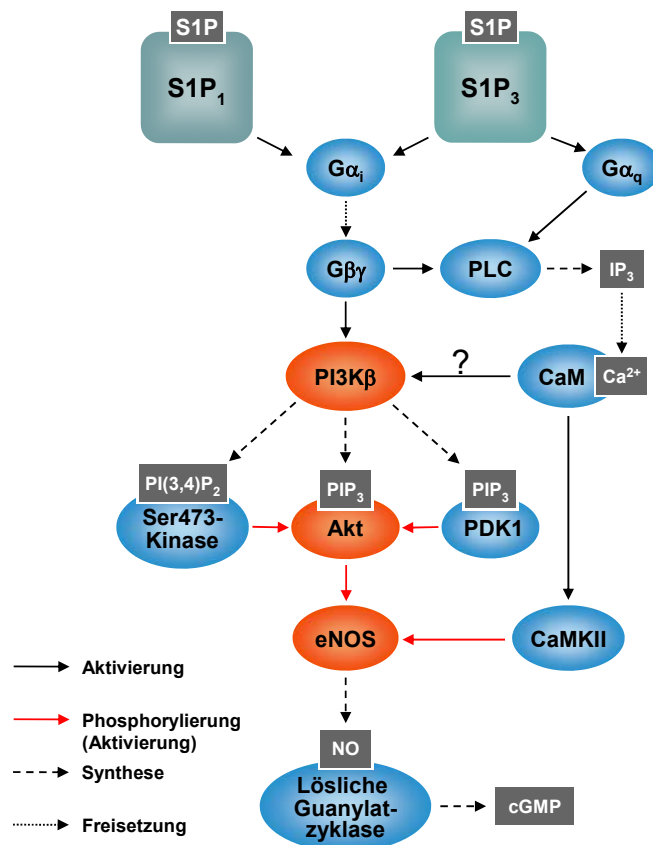


Abbildung 38: Modell für den S1P-induzierten PI3Kβ/Akt/eNOS-Signalweg in HUVEC

Beide S1P-Rezeptortypen in HUVEC können über G_i-Proteine zur Aktivierung der PI3Kβ führen. Dabei spielt zusätzlich die Freisetzung von Calcium-Ionen eine wichtige Rolle. Laut Literatur erfolgt die Ca²⁺-Freisetzung wahrscheinlich über den PLC/IP₃-Weg, der wiederum über Gβγ und/oder Gα_q stimuliert werden kann. Die PI3Kβ ist die PI3K-Isoform, welche für die Phosphorylierung von Akt verantwortlich ist und vermittelt dies durch die Produktion von PI(3,4)P₂ und PIP₃. Dieser PI3Kβ/Akt-Weg trägt zur Phosphorylierung der eNOS bei, die dadurch aktiviert wird und NO synthetisiert, wodurch die lösliche Guanylatzyklase zur cGMP-Produktion angeregt wird. Weitere Prozesse, die an der eNOS-Phosphorylierung beteiligt sind, sind ebenfalls Ca²⁺-abhängig. Laut Literatur ist eine Involvierung der CaMKII wahrscheinlich.

4.4 S1P-induzierte ERK1/2-Phosphorylierung

Die Stimulation von HUVEC mit S1P führte unter unseren Bedingungen zu einem zeitabhängigen Anstieg der ERK1/2-Phosphorylierung. Die Phosphorylierung war nach 1 min nachweisbar, erreichte ihr Maximum zwischen 2 und 5 min und war nach 10 min wieder auf den 1-min-Wert gesunken. Die von uns beobachtete Kinetik stimmt mit den Ergebnissen anderer Arbeiten in HUVEC (Kimura *et al.* 2001) und BAEC (Igarashi *et al.* 2001) überein.

Die in unserer Studie gemessene S1P-induzierte ERK1/2-Phosphorylierung erfolgte unabhängig von einer Transaktivierung von Rezeptortyrosinkinasen. Wir konnten zeigen, daß die ERK1/2-Phosphorylierung nach S1P weder durch EGFR-Inhibitoren noch durch VEGFR-2-Inhibitoren oder den generellen Tyrosinkinase-Inhibitor Genistein beeinträchtigt wurde. Im Gegensatz dazu war die S1P-induzierte ERK1/2-Phosphorylierung in COS-1-Zellen (Endo *et al.* 2002) und Rat-2-Zellen (Kim *et al.* 2000) von der Transaktivierung des EGFR abhängig. In Übereinstimmung mit unseren Daten zeigten Endo

und Mitarbeiter, daß S1P in HUVEC nicht den EGFR transaktiviert und die S1P-induzierte ERK1/2-Phosphorylierung nicht über die VEGFR-2-Transaktivierung erfolgt (Endo *et al.* 2002).

Die von uns beobachtete ERK1/2-Phosphorylierung wurde durch Pertussistoxin vollständig gehemmt und wird daher über G_i -Proteine vermittelt. Damit konnten wir die Daten von Endo und Mitarbeitern bestätigen, die eine Abhängigkeit der S1P-induzierten ERK1/2-Phosphorylierung von G_i in HUVEC nachwiesen (Endo *et al.* 2002). Auch in humanen Koronararterien-Endothelzellen wurde gezeigt, daß S1P zur ERK1/2-Aktivierung über G_i -Proteine führt (Miura *et al.* 2003).

Wortmannin hemmte die S1P-induzierte ERK1/2-Phosphorylierung dagegen nur partiell, was darauf hindeutet, daß PI3Ks eine Rolle in diesem Signalweg spielen, es aber auch einen PI3K-unabhängigen Weg der S1P-induzierten ERK1/2-Phosphorylierung gibt. Eine Möglichkeit wäre der $S1P_1/G\beta\gamma/PLC/Ca^{2+}$ -Weg (Kluk & Hla 2002), durch den PKC aktiviert wird, die dann über Raf die ERK1/2-MAPK-Kaskade in Gang setzen könnte (Werry *et al.* 2005). Eine Kombination von PI3K- und PLC/Ca^{2+} -abhängigen Signalwegen wurde für die PDGF-induzierte ERK1/2-Phosphorylierung in der Fibroblastenzelllinie „Swiss-3T3“ (Duckworth & Cantley 1997) und für die PAF-induzierte Phosphorylierung von ERK1/2 in Makrophagen gezeigt (Ferby *et al.* 1996). Unter unseren Bedingungen führte der Calcium-Chelator BAPTA-AM zu einem späteren Beginn der S1P-induzierten ERK1/2-Aktivierung und einer Verschiebung der maximalen Antwort auf einen späteren Zeitpunkt, das Ausmaß der ERK1/2-Aktivierung wurde jedoch nicht beeinflusst. Möglicherweise gibt es in HUVEC verschiedene Signalwege für die S1P-induzierte ERK1/2-Phosphorylierung, und nur die frühe Phase ist calciumabhängig. Im Unterschied dazu wurde in BAEC gezeigt, daß die S1P-induzierte ERK1/2-Phosphorylierung durch Behandlung der Zellen mit BAPTA-AM deutlich verstärkt wird (Igarashi *et al.* 2001), was erneut auf unterschiedliche Signalwege in HUVEC und BAEC hinweist. Die durch S1P initiierte ERK1/2-MAPK-Kaskade scheint in BAEC nicht über Calcium-Freisetzung oder PI3Ks zu verlaufen, sondern eventuell über die Transaktivierung des VEGFR-2 (Tanimoto *et al.* 2002) und die Rezeptortyrosinkinase-induzierte Ras-Aktivierung.

Unsere Daten lassen anhand der Effekte von Wortmannin eine Involvierung von PI3Ks in die Aktivierung der ERK1/2-MAPK-Kaskade vermuten. Sie stimmen damit mit den Befunden von Hawes und Mitarbeitern überein, die eine Beteiligung von Klasse-IA-PI3K bei der G_i -vermittelten Phosphorylierung von ERK1/2 in CHO und COS-7-Zellen zeigen konnten (Hawes *et al.* 1996), stehen jedoch im Gegensatz zu den Ergebnissen in BAEC, wo Wortmannin nicht hemmend auf die ERK1/2-Aktivierung wirkt (Igarashi *et al.* 2001; Bernatchez *et al.* 2003). Wie der Wortmannin-sensitive Signalweg in unserem System verläuft, ist noch ungeklärt. Wir konnten keine Hemmung der S1P-induzierten ERK1/2-Phosphorylierung in HUVEC durch die Isoform-spezifische Inhibitoren für PI3K β (TGX-221), PI3K γ (AS-252424) und PI3K δ (IC87114) nachweisen, was gegen eine Funktion der entsprechenden PI3K-Isoformen spricht. Das steht im Gegensatz zu der in COS-7 Zellen gezeigten Rolle der PI3K γ in der ERK1/2-Aktivierung (Lopez-Illasaca *et al.* 1997; Bondeva *et al.* 1998). Möglicherweise spielt unter unseren Bedingungen PI3K α eine Rolle, obwohl nicht klar ist, wie S1P diese Isoform aktiviert, zumal die Bedeutung einer Transaktivierung von Rezeptortyrosinkinasen für die Initiierung des ERK1/2-Signalweges ausgeschlossen wurde. Experimente zur Charakterisierung eines PI3K α -abhängigen Signalwegs konnten im Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführt werden, da ein entsprechender Inhibitor zum Zeitpunkt der Untersuchungen nicht zur Verfügung stand. Arbeiten an humanen Lungenendothelzellen deuten allerdings darauf hin, daß die PI3K α bei der ERK1/2-Phosphorylierung von Bedeutung sein könnte (Singleton *et al.* 2005;

Dudek *et al.* 2007). Alternativ zu PI3K α könnte die Phosphorylierung von ERK1/2 jedoch auch durch die Klasse-II-PI3K-Isoformen PI3K-C2 β oder PI3K-C2 γ erfolgen, da diese gleichfalls Wortmannin-sensitiv sind (Traer *et al.* 2006). Zudem ergab eine Sequenzanalyse der PI3K-C2 γ vier mögliche ERK1/2-Bindungsstellen (Caldwell *et al.* 2006). Des weiteren wurde gezeigt, daß Wortmannin die Serin/Threonin-Kinasen Plk1 (*polo-like kinase 1*) und Plk3 inhibiert (Liu *et al.* 2007), so daß auch diese Proteine potentiell in Frage kommen. Es sind also weitere Untersuchungen nötig, um die Wirkung von Wortmannin auf die S1P-induzierte Phosphorylierung von ERK1/2 in HUVEC zu erklären.

Die Frage, ob PI3Ks die Aktivierung von ERK1/2 über ihre Lipidkinaseaktivität oder ihre Proteinkinaseaktivität beeinflussen, wird bisher kontrovers diskutiert. In COS-7-Zellen wurde beispielsweise gezeigt, daß die Produktion von PIP₃ nicht zur ERK1/2-Aktivierung führt, sondern die Proteinkinaseaktivität der PI3K dafür von Bedeutung ist (Bondeva *et al.* 1998). Andererseits zeigen Arbeiten in NIH-3T3-Zellen und HEK-293-Zellen, daß PI3K/PIP₃-induzierte Rekrutierung von PDK-1 zur Aktivierung von PKC δ und PKC ζ führt (Chou *et al.* 1998; Le Good *et al.* 1998), wodurch nachfolgend die ERK1/2-MAPK-Kaskade aktiviert wird (Diaz-Meco *et al.* 1994; Ueda *et al.* 1996; Schönwasser *et al.* 1998). Anhand unserer Daten kann keine Aussage über die Bedeutung von Lipidkinase- oder Proteinkinaseaktivität getroffen werden. Wir können jedoch vermuten, daß die S1P-induzierte PIP₃-Produktion durch Inhibierung der PI3K β vollständig gehemmt ist, da unter diesen Bedingungen auch die Akt-Phosphorylierung vollständig gehemmt war. Das würde möglicherweise dafür sprechen, daß PIP₃ und damit die PI3K-Lipidkinase-Aktivität für die ERK1/2-Aktivierung von geringer Bedeutung ist und unterstützt eher die Möglichkeit der direkten Phosphorylierung von Proteinen der ERK1/2-MAPK-Kaskade durch PI3Ks. Die Tatsache, daß die S1P-induzierte ERK1/2-Aktivierung nicht durch TGX-221 gehemmt wurde, bedeutet auch, daß sie nicht durch Akt vermittelt wird. Das paßt zu der Aussage, daß die Überexpression von dominant-negativem Akt in HUVEC die S1P-induzierte ERK1/2-Aktivierung nicht verringert (Rikitake *et al.* 2002).

Zusammenfassend kann man sagen, daß die S1P-induzierte Phosphorylierung von ERK1/2 in HUVEC G_i-Protein-vermittelt über verschiedene Signalwege erfolgt, bei denen Wortmannin-sensitive Kinasen und die Freisetzung von Calcium eine Rolle spielen. Die PI3K β , PI3K γ und PI3K δ sind dabei ebenso wenig involviert wie Tyrosinkinasen und Akt.

4.5 S1P-induzierte Rac1-Aktivierung

Nach Stimulation von HUVEC mit S1P kommt es zu einer zeitabhängigen Aktivierung der GTPase Rac1 mit einem Maximum bei 1 min. Nach 5 min ist in unserem System das Signal bereits auf 1/3 des Maximalwertes gesunken. Dagegen zeigte Rac1-Aktivierung in S1P₁-transfizierten CHO-Zellen eine verzögerte Kinetik mit einem Peak bei 3 min (Lee *et al.* 2001).

Die S1P-induzierte Aktivierung von Rac1 wurde in unserer Studie partiell von PI3Ks vermittelt. Sowohl Wortmannin als auch der PI3K β -Inhibitor TGX-221 und der PI3K γ -Inhibitor AS-252424 führten zu einer Hemmung der Rac1-Aktivierung. Dabei hatte die Inhibition aller PI3Ks durch Wortmannin den gleichen Effekt wie jeweils die Inhibition von PI3K β oder PI3K γ . Eine mögliche Erklärung dafür wäre, daß beide PI3K-Isoformen kooperativ an der Rac1-Aktivierung beteiligt sind. Fällt eine Isoform aus, kann die andere dies nicht kompensieren. Möglicherweise ist die PI3K β -vermittelte PIP₃-Produktion für die Translokation von Rac1-GEFs zur Plasmamembran nötig, während die PI3K γ über

ihre Proteinkinaseaktivität für die Phosphorylierung und Aktivierung dieser Rac1-GEFs sorgt.

Unsere Befunde stehen im Widerspruch zu den Daten von Gonzalez und Mitarbeitern, die in BAEC eine PI3K-unabhängige Aktivierung von Rac1 fanden (Gonzalez *et al.* 2006). Darüber hinaus wurde in der Arbeit von Gonzalez *et al.* und einer weiteren Untersuchung in BAEC gezeigt, daß Rac1 dem PI3K β /Akt/eNOS-Signalweg vorausgeschaltet ist (Levine *et al.* 2007). Diese Daten konnten in unserer Arbeit ebenfalls nicht bestätigt werden. Der Rac1-spezifische Inhibitor NSC-23766 hatte keine hemmende Wirkung auf die Phosphorylierung von Akt, woraus wir schlußfolgern, daß Rac1 die dafür verantwortliche PI3K β nicht aktiviert. Damit ist es auch unwahrscheinlich, daß in unserem System ein Verstärkermechanismus existiert, über den Rac1, welches durch PI3K β aktiviert wird, wieder zur Stimulierung der PI3K β führt, wie das in der Literatur beschrieben wurde.

Während einerseits Rac1 den PI3K β /Akt-Signalweg stimulieren soll, gibt es auch Literaturdaten, die demonstrieren, daß Rac1 Akt-abhängig aktiviert wird. Lee und Mitarbeitern zeigten in S1P₁-transfizierten CHO-Zellen, daß Rac1 der Akt-Aktivierung nachgeschaltet ist und vermuteten, daß die Akt-vermittelte Phosphorylierung des Rezeptors S1P₁ dafür verantwortlich ist (Lee *et al.* 2001). Auch diese Vermutung konnte in unserer Studie nicht bestätigt werden. Zum einen zeigt bereits der Vergleich der Kinetik von Rac1-Aktivierung (Maximum bei 1 min) und Akt-Phosphorylierung (Maximum bei 2 min), daß erstere schneller abläuft. Zum anderen führte die Vorinkubation von Zellen mit einem spezifischen Akt1/2-Inhibitor, der die S1P-induzierte Akt-Phosphorylierung vollständig blockierte, nicht zu einer Hemmung, sondern sogar zu einer Verstärkung der Rac1-Aktivierung. Eine Erklärung dafür liefert die Arbeit von Barnett und Mitarbeitern über PH-Domäne-abhängige und Isoform-spezifische Akt-Inhibitoren (Barnett *et al.* 2005). Möglicherweise blockiert der Akt1/2-Inhibitor die Interaktion der PH-Domäne von Akt mit PIP₃. Dadurch wäre mehr PIP₃ für die Bindung von Rac1-GEFs vorhanden und mehr Rac1 könnte aktiviert werden.

Die unvollständige Hemmung der Rac1-Aktivierung durch PI3K-Inhibitoren deutet auf einen zusätzlichen Signalweg hin, über den Rac1 aktiviert werden kann. Eventuell spielt dabei eine PKC-vermittelte Freisetzung von GTP-Rac1 aus Rac-GDI-Komplexen (Price *et al.* 2003) eine Rolle. Ob dieser Signalweg den PI3K-unabhängigen Teil der Rac1-Aktivierung darstellt, muß in weiterführenden Experimenten jedoch noch geklärt werden.

Zusammenfassend ist zu sagen, daß die S1P-induzierte Rac1-Aktivierung in HUVEC partiell durch PI3K β und PI3K γ vermittelt wird. Die PI3K β / γ -abhängige Rac1-Aktivierung verläuft jedoch unabhängig von der PI3K β -initiierten Akt-Aktivierung. Ebenso wenig ist Rac1 in die Aktivierung von Akt einbezogen, so daß diese beiden Signalwege unabhängig voneinander operieren.

4.6 S1P-induzierte Migration von Endothelzellen

S1P induziert in HUVEC eine chemotaktische Antwort und regt die Zellen zur Migration in Richtung des S1P-Gradienten an (Lee *et al.* 2000). Ziel dieser Arbeit war es, die Bedeutung verschiedener S1P-induzierter Signalwege, vor allem die Rolle der G_i-Proteinsensitiven PI3Ks β und γ , für die Vermittlung der endothelialen Migration zu untersuchen.

Unsere Daten bestätigen, daß die S1P-induzierte Migration in HUVEC vollständig durch Pertussistoxin gehemmt und daher über heterotrimere G_i-Proteine vermittelt wird, wie es bereits in Untersuchungen an BAEC beschrieben wurde (Lee *et al.* 2000). Auch die

Inhibition von PI3Ks mit Wortmannin führte in unserer Arbeit zu einer Hemmung der S1P-induzierten Migration, woraus sich eine Funktion von PI3Ks in der Regulation der Migration ableiten läßt. Damit unterstützen unsere Befunde Untersuchungen aus Rinderlungenarterien-Endothelzellen, die zum gleichen Ergebnis kommen (Katkade *et al.* 2005). Dagegen wird die Bedeutung der PI3Ks für die Migration in BAEC kontrovers diskutiert (Lee *et al.* 2000; Bernatchez *et al.* 2003).

Da die S1P-induzierte Migration in unsere Studie sowohl Pertussistoxin- als auch Wortmannin-sensitiv war, konzentrierten wir uns auf die Untersuchung der G_i-Proteinsensitiven PI3K-Isoformen PI3K β und PI3K γ . Die Rolle von PI3K-Isoformen als Vermittler der S1P-induzierten endothelialen Migration war bisher nicht untersucht worden. Unsere Daten zeigen, daß die Isoform-spezifische Hemmung von PI3K β (TGX-221) oder PI3K γ (AS252424) die S1P-induzierte Migration inhibiert, so daß auf eine wichtige Rolle von sowohl PI3K β als auch PI3K γ geschlossen werden kann. Die gleichzeitige Inhibition beider Isoformen ergab dabei einen additiven Effekt, was vermuten läßt, daß die beiden Isoformen unterschiedliche migrationsrelevante Zielproteine haben.

Ein Zielprotein für PI3K β und PI3K γ ist wie in Kapitel 4.5 beschrieben die GTPase Rac1, ein wichtiger Mediator der Reorganisation des Zytoskeletts. Die Bedeutung von Rac1 für die Migration wurde bisher vorwiegend in Blutzellen untersucht (Watanabe *et al.* 2005; Bustelo *et al.* 2007). Unsere Daten zeigen, daß Rac1 auch in HUVEC eine essentielle Rolle bei der S1P-induzierten Migration spielt. Die Hemmung von Rac1 durch den spezifischen Inhibitor NSC-23766 führte zu einer ausgeprägten Hemmung des Effektes von S1P auf die Migration. Daraus läßt sich ableiten, daß der PI3K β / γ -Rac1-Signalweg einer der für die S1P-induzierte Migration verantwortlichen Wege ist. Gonzalez und Kollegen konnten die Rolle von Rac1 als Vermittler der S1P-initiierten Migration durch Rac1-Knockdown in BAEC bestätigen (Gonzalez *et al.* 2006), obwohl in dieser Arbeit Rac1 nicht durch PI3Ks aktiviert wurde, sondern umgekehrt zur Stimulierung von PI3K/Akt/eNOS führte.

Neben Rac1, das von beiden PI3K-Isoformen aktiviert wird, konnten wir in unserer Arbeit die Proteinkinase Akt als ein PI3K β -isoformspezifisches Zielprotein charakterisieren (siehe Kapitel 4.2), während für PI3K γ bisher keine weiteren Effektoren identifiziert wurden. Laut Literatur können verschiedene Akt-Isoformen abhängig vom Zelltyp sowohl stimulierend als auch hemmend auf die Migration wirken (Stambolic & Woodgett 2006). Katkade und Mitarbeitern fanden bereits eine tragende Rolle von Akt in der S1P-induzierten Migration von Rinderlungenarterien-Endothelzellen (Katkade *et al.* 2005). Wir konnten ebenfalls nachweisen, daß Akt eine wichtige Funktion in der Vermittlung der Migrationsantwort auf S1P ausübt und darüber hinaus Hinweise auf die dafür verantwortlich Akt-Isoform erhalten. Die Behandlung der Zellen mit einem spezifischen Akt1/2-Inhibitor führt zu einer deutlichen Hemmung der S1P-induzierten Migration. Da Akt2 in Endothelzellen nicht exprimiert ist (Fieber *et al.* 2006) und die Akt-Phosphorylierung durch den genannten Inhibitor vollständig blockiert wurde, stimuliert S1P vermutlich Akt1. Akt1 ist damit auch die Akt-Isoform, die die Migration der Endothelzellen nach S1P-Stimulation vermittelt. In ähnlicher Weise war Akt1 auch für die VEGF-induzierte Migration von HUVEC wichtig (Primo *et al.* 2007).

Ein möglicher Effektor in der Akt-vermittelten Migrationsantwort von Endothelzellen ist die eNOS (Dudzinski *et al.* 2006). In einer Arbeit von Rikitake und Mitarbeitern wurde gezeigt, daß eine Hemmung der katalytischen Aktivität der eNOS durch L-NAME eine schwache, aber signifikante Verringerung der S1P-induzierten Migration von HUVEC bewirkte (Rikitake *et al.* 2002). Andererseits konnte ein Einfluß von L-NAME auf die S1P-induzierte Migration nicht bestätigt werden (Morales-Ruiz *et al.* 2001). Unsere

Daten befinden sich im Einklang mit letzterer Studie, da auch in unseren Experimenten L-NAME keine Wirkung auf die S1P-induzierte Migration zeigte. Daraus schlußfolgern wir, daß die PI3K β /Akt1-induzierte Migrationsantwort nicht über eNOS kontrolliert wird. Möglicherweise hängt das mit dem geringen Grad der eNOS-Aktivierung nach S1P zusammen. Wir konnten zeigen, daß S1P zwar zu einer Erhöhung von cGMP, einem Indikator für die intrazelluläre Bildung von NO, führt, der Effekt aber deutlich geringer ist als nach Stimulierung der Zellen mit VEGF. In Übereinstimmung mit dieser Vermutung scheint eNOS für die Vermittlung der Migration nach Stimulierung mit VEGF oder Endothelin eine wichtige Rolle zu spielen (Noiri *et al.* 1997; Dimmeler *et al.* 2000; Morales-Ruiz *et al.* 2000; Morales-Ruiz *et al.* 2001). Aus unseren Befunden und den Literaturdaten können wir daher ableiten, daß die Rolle der eNOS in der Migration in Abhängigkeit vom Stimulus und dem Grad der eNOS-Aktivierung variiert.

Akt1 beeinflußt die S1P-induzierte Migration nicht nur unabhängig von eNOS, sondern auch unabhängig von Rac1. Wie im Kapitel 4.5 diskutiert, ist nach S1P-Stimulierung von HUVEC keine Interaktion von Akt1 und Rac1 nachweisbar. Andere Effektoren von Akt, die für die Regulation der Migration relevant sein könnten, sind PAK, Girdin und ACAP1 (Menard & Mattingly 2004). So wurde bereits gezeigt, daß Akt unabhängig von Rac zur Stimulation der Kinase PAK führte (Menard & Mattingly 2004), die eigentlich als Rac-Effektor bekannt ist (Watanabe *et al.* 2005).

Unsere Daten zeigen, daß die S1P-induzierte Migration der untersuchten Endothelzellen neben einem PI3K β / γ -abhängigen auch einen PI3K β / γ -unabhängigen Signalweg involviert, da die eingesetzten Isoform-spezifischen PI3K-Inhibitoren nicht in der Lage waren, die S1P-induzierte Migration vollständig zu hemmen. Möglicherweise spielt hier der durch S1P stimulierte ERK1/2-Signalweg eine Rolle. Unsere Daten zeigen, daß der MEK-Inhibitor PD-98059 die Migrationsantwort der HUVEC auf S1P deutlich verringert, was die Wichtigkeit von ERK1/2 in der S1P-induzierten Migration von HUVEC beweist. Auch andere Studien sprechen den MAP-Kinasen ERK1/2 eine Rolle in der Migration zu (Huang *et al.* 2004). Allerdings kamen Arbeiten an Endothelzellen bisher zu einem gegenteiligen Ergebnis. So hatte die Behandlung von HAEC (Kimura *et al.* 2000) und BAEC (Bernatchez *et al.* 2003) mit PD-98059 keine Wirkung auf die S1P-induzierte Migration dieser Zellen. Zukünftige Untersuchungen müssen klären, ob Wortmannin und PD-98059 additive Effekte haben.

Die zur Rolle verschiedener Signalwege in der Vermittlung der S1P-induzierten Migration von Endothelzellen durchgeführten Untersuchungen ergaben zusammenfassend, daß die Proteine Akt1, Rac1 und ERK1/2 wichtige Effektormoleküle sind. Vermittelt wird deren Aktivierung zum Teil durch PI3K β (Akt1), PI3K β und γ (Rac1) oder unbekannte Wortmannin-sensitive Kinasen (ERK1/2). Rac1-Aktivierung und Akt1-Aktivierung und damit die Beeinflussung der Migration durch diese beiden Moleküle erfolgen unabhängig voneinander. Die durch S1P aktivierte eNOS hat in den von uns untersuchten HUVEC keine migrationsfördernde Relevanz.

Die Ergebnisse der Arbeit werden in Abbildung 39 zusammenfassend dargestellt.

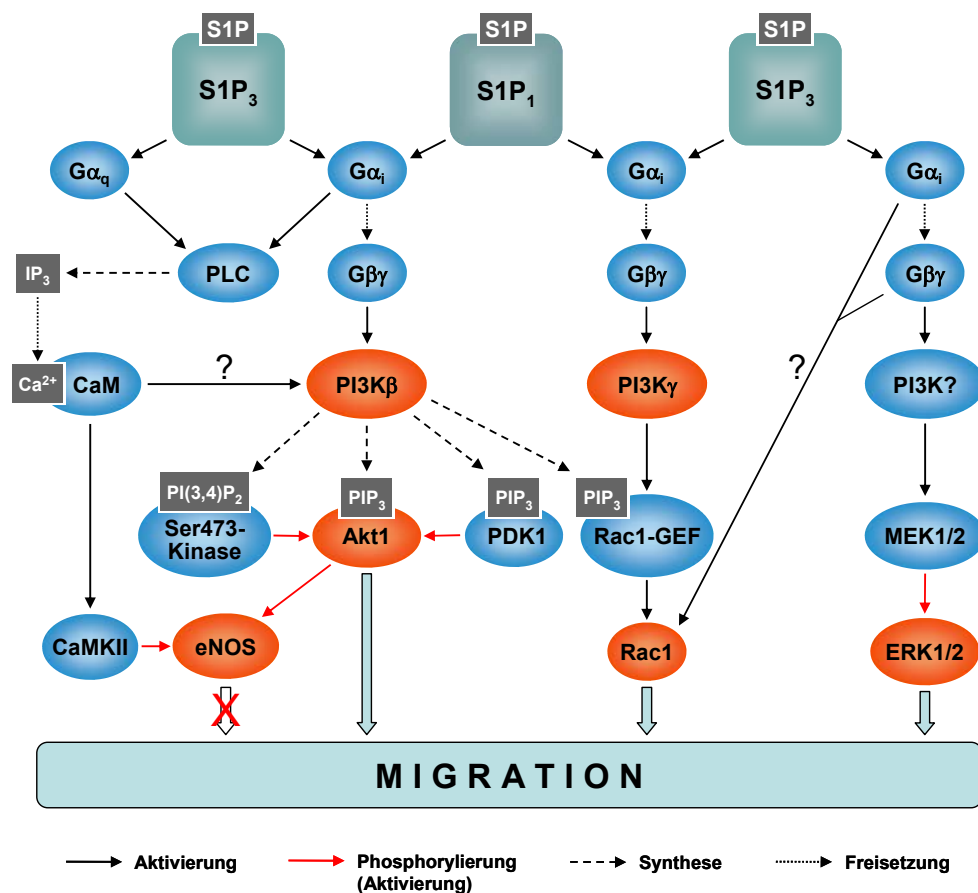


Abbildung 39: Modell der untersuchten S1P-induzierten Signalwege in HUVEC

Pertussistoxin-sensitive heterotrimere G-Proteine sind essentiell für die Weiterleitung S1P-induzierter Signale, die zur Aktivierung von Akt1, Rac1 und ERK1/2 führen und dadurch die Migration von HUVEC bewirken. Die Phosphorylierung von Akt1 verläuft calciumabhängig über die PI3K β . Die Ca²⁺-Freisetzung erfolgt laut Literatur wahrscheinlich über den PLC/IP₃-Weg. Die S1P-induzierte schwache Aktivierung der eNOS hat keine Bedeutung für die Migration. Die Aktivierung von Rac1 erfolgt über PI3K β , PI3K γ und einen noch unbekannten Signalweg. Für die Aktivierung einiger Rac1-GEFs sind laut Literatur die Bindung an PIP₃ und/oder verschiedene Proteine sowie die Phosphorylierung der GEFs wichtig. Die Daten lassen eine PIP₃-vermittelte Wirkung der PI3K β vermuten. Die PI3K γ vermittelt möglicherweise die Signale mittels ihrer Proteinkinaseaktivität. Die Phosphorylierung der Kinasen ERK1/2 verläuft wahrscheinlich über PI3-Kinasen, da sie Wortmannin-sensitiv ist. Die verantwortliche Isoform wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht gefunden. Die PI3K-Isoformen PI3K β , PI3K γ und PI3K δ konnten jedoch ausgeschlossen werden.

5 Literatur

- Affolter, M. and C. J. Weijer (2005). Signaling to cytoskeletal dynamics during chemotaxis. *Dev Cell* **9**(1): 19-34.
- Alberts, B., D. Bray, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts and J. D. Watson (1995). *Molekularbiologie der Zelle*. Weinheim; New York; Basel; Cambridge; Tokyo, VCH Verlagsgesellschaft mbH.
- Alessi, D. R., A. Cuenda, P. Cohen, D. T. Dudley and A. R. Saltiel (1995). PD 098059 is a specific inhibitor of the activation of mitogen-activated protein kinase kinase in vitro and in vivo. *J. Biol. Chem.* **270**(46): 27489-94.
- Alessi, D. R., S. R. James, C. P. Downes, A. B. Holmes, P. R. Gaffney, C. B. Reese and P. Cohen (1997). Characterization of a 3-phosphoinositide-dependent protein kinase which phosphorylates and activates protein kinase B α . *Curr. Biol.* **7**(4): 261-9.
- An, H. J., N. H. Cho, H. S. Yang, K. B. Kwak, N. K. Kim, D. Y. Oh, S. W. Lee, H. O. Kim and J. J. Koh (2007). Targeted RNA interference of phosphatidylinositol 3-kinase p110- β induces apoptosis and proliferation arrest in endometrial carcinoma cells. *J. Pathol.* **212**(2): 161-9.
- Andjelkovic, M., D. R. Alessi, R. Meier, A. Fernandez, N. J. Lamb, M. Frech, P. Cron, P. Cohen, J. M. Lucocq and B. A. Hemmings (1997). Role of translocation in the activation and function of protein kinase B. *J. Biol. Chem.* **272**(50): 31515-24.
- Andjelkovic, M., T. Jakubowicz, P. Cron, X. F. Ming, J. W. Han and B. A. Hemmings (1996). Activation and phosphorylation of a pleckstrin homology domain containing protein kinase (RAC-PK/PKB) promoted by serum and protein phosphatase inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**(12): 5699-704.
- Arenz, C. and U. Schepers (2003). RNA interference: from an ancient mechanism to a state of the art therapeutic application? *Naturwissenschaften* **90**(8): 345-59.
- Barnett, S. F., D. Defeo-Jones, S. Fu, P. J. Hancock, K. M. Haskell, R. E. Jones, J. A. Kahana, A. M. Kral, K. Leander, L. L. Lee, J. Malinowski, E. M. McAvoy, D. D. Nahas, R. G. Robinson and H. E. Huber (2005). Identification and characterization of pleckstrin-homology-domain-dependent and isoenzyme-specific Akt inhibitors. *Biochem. J.* **385**(Pt 2): 399-408.
- Bartlett, D. W. and M. E. Davis (2006). Insights into the kinetics of siRNA-mediated gene silencing from live-cell and live-animal bioluminescent imaging. *Nucleic Acids Res.* **34**(1): 322-33.
- Bayascas, J. R. and D. R. Alessi (2005). Regulation of Akt/PKB Ser473 phosphorylation. *Mol. Cell* **18**(2): 143-5.
- Bernatchez, P. N., F. Tremblay, S. Rollin, P. E. Neagoe and M. G. Sirois (2003). Sphingosine 1-phosphate effect on endothelial cell PAF synthesis: role in cellular migration. *J. Cell. Biochem.* **90**(4): 719-31.
- Bokoch, G. M. (2003). Biology of the p21-activated kinases. *Annu. Rev. Biochem.* **72**: 743-81.

- Bondeva, T., L. Pirola, G. Bulgarelli-Leva, I. Rubio, R. Wetzker and M. P. Wymann (1998). Bifurcation of lipid and protein kinase signals of PI3Kgamma to the protein kinases PKB and MAPK. *Science* **282**(5387): 293-6.
- Bonetta, L. (2004). RNAi: Silencing never sounded better. *Nature Methods* **1**(1): 79-86.
- Brachmann, S. M., K. Ueki, J. A. Engelman, R. C. Kahn and L. C. Cantley (2005). Phosphoinositide 3-kinase catalytic subunit deletion and regulatory subunit deletion have opposite effects on insulin sensitivity in mice. *Mol. Cell. Biol.* **25**(5): 1596-607.
- Brock, C., M. Schaefer, H. P. Reusch, C. Czupalla, M. Michalke, K. Spicher, G. Schultz and B. Nurnberg (2003). Roles of G beta gamma in membrane recruitment and activation of p110 gamma/p101 phosphoinositide 3-kinase gamma. *J. Cell Biol.* **160**(1): 89-99.
- Brodbeck, D., P. Cron and B. A. Hemmings (1999). A human protein kinase Bgamma with regulatory phosphorylation sites in the activation loop and in the C-terminal hydrophobic domain. *J. Biol. Chem.* **274**(14): 9133-6.
- Brouet, A., P. Sonveaux, C. Dessy, J. L. Balligand and O. Feron (2001). Hsp90 ensures the transition from the early Ca²⁺-dependent to the late phosphorylation-dependent activation of the endothelial nitric-oxide synthase in vascular endothelial growth factor-exposed endothelial cells. *J. Biol. Chem.* **276**(35): 32663-9.
- Bulotta, S., A. Cerullo, R. Barsacchi, C. D. Palma, D. Rotiroti, E. Clementi and N. Borgese (2006). Endothelial nitric oxide synthase is segregated from caveolin-1 and localizes to the leading edge of migrating cells. *Exp. Cell Res.* **312**(6): 877-89.
- Bustelo, X. R., V. Sauzeau and I. M. Berenjeno (2007). GTP-binding proteins of the Rho/Rac family: regulation, effectors and functions in vivo. *Bioessays* **29**(4): 356-70.
- Caldwell, K. K., M. Sosa and C. T. Buckley (2006). Identification of mitogen-activated protein kinase docking sites in enzymes that metabolize phosphatidylinositols and inositol phosphates. *Cell Commun. Signal.* **4**(1): 2.
- Campbell, M. and E. R. Trimble (2005). Modification of PI3K- and MAPK-dependent chemotaxis in aortic vascular smooth muscle cells by protein kinase CbetaII. *Circ. Res.* **96**(2): 197-206.
- Canagarajah, B. J., A. Khokhlatchev, M. H. Cobb and E. J. Goldsmith (1997). Activation mechanism of the MAP kinase ERK2 by dual phosphorylation. *Cell* **90**(5): 859-69.
- Caplen, N. J. (2003). RNAi as a gene therapy approach. *Expert. Opin. Biol. Ther.* **3**(4): 575-86.
- Carmeliet, P. (2000). Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat. Med.* **6**(4): 389-95.

- Caunt, C. J., A. R. Finch, K. R. Sedgley and C. A. McArdle (2006). Seven-transmembrane receptor signalling and ERK compartmentalization. *Trends Endocrinol. Metab.* **17**(7): 276-83.
- Cernuda-Morollon, E. and A. J. Ridley (2006). Rho GTPases and leukocyte adhesion receptor expression and function in endothelial cells. *Circ. Res.* **98**(6): 757-67.
- Chae, S. S., J. H. Paik, H. Furneaux and T. Hla (2004). Requirement for sphingosine 1-phosphate receptor-1 in tumor angiogenesis demonstrated by in vivo RNA interference. *J. Clin. Invest.* **114**(8): 1082-9.
- Chalfant, C. E. and S. Spiegel (2005). Sphingosine 1-phosphate and ceramide 1-phosphate: expanding roles in cell signaling. *J. Cell Sci.* **118**(Pt 20): 4605-12.
- Chen, H. C., P. A. Appeddu, H. Isoda and J. L. Guan (1996). Phosphorylation of tyrosine 397 in focal adhesion kinase is required for binding phosphatidylinositol 3-kinase. *J. Biol. Chem.* **271**(42): 26329-34.
- Chou, M. M., W. Hou, J. Johnson, L. K. Graham, M. H. Lee, C. S. Chen, A. C. Newton, B. S. Schaffhausen and A. Toker (1998). Regulation of protein kinase C zeta by PI 3-kinase and PDK-1. *Curr. Biol.* **8**(19): 1069-77.
- Cicenas, J., P. Urban, V. Vuaroqueaux, M. Labuhn, W. Kung, E. Wight, M. Mayhew, U. Eppenberger and S. Eppenberger-Castori (2005). Increased level of phosphorylated akt measured by chemiluminescence-linked immunosorbent assay is a predictor of poor prognosis in primary breast cancer overexpressing ErbB-2. *Breast Cancer Res.* **7**(4): R394-401.
- Corbett, K. D. and T. Alber (2001). The many faces of Ras: recognition of small GTP-binding proteins. *Trends Biochem. Sci.* **26**(12): 710-6.
- Couzin, J. (2004). Molecular biology. RNAi shows cracks in its armor. *Science* **306**(5699): 1124-5.
- Cudmore, M., S. Ahmad, B. Al-Ani, P. Hewett, S. Ahmed and A. Ahmed (2006). VEGF-E activates endothelial nitric oxide synthase to induce angiogenesis via cGMP and PKG-independent pathways. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **345**(4): 1275-82.
- Czauderna, F., M. Fechtner, H. Aygun, W. Arnold, A. Klippel, K. Giese and J. Kaufmann (2003a). Functional studies of the PI(3)-kinase signalling pathway employing synthetic and expressed siRNA. *Nucleic Acids Res.* **31**(2): 670-82.
- Czauderna, F., A. Santel, M. Hinz, M. Fechtner, B. Durieux, G. Fisch, F. Leenders, W. Arnold, K. Giese, A. Klippel and J. Kaufmann (2003b). Inducible shRNA expression for application in a prostate cancer mouse model. *Nucleic Acids Res.* **31**(21): e127.
- Diaz-Meco, M. T., I. Dominguez, L. Sanz, P. Dent, J. Lozano, M. M. Municio, E. Berra, R. T. Hay, T. W. Sturgill and J. Moscat (1994). zeta PKC induces phosphorylation and inactivation of I kappa B-alpha in vitro. *EMBO J.* **13**(12): 2842-8.

- Dimmeler, S., E. Dernbach and A. M. Zeiher (2000). Phosphorylation of the endothelial nitric oxide synthase at ser-1177 is required for VEGF-induced endothelial cell migration. *FEBS Lett.* **477**(3): 258-62.
- Downes, C. P., N. R. Leslie, I. H. Batty and J. van der Kaay (2007). Metabolic switching of PI3K-dependent lipid signals. *Biochem. Soc. Trans.* **35**(Pt 2): 188-92.
- Duckworth, B. C. and L. C. Cantley (1997). Conditional inhibition of the mitogen-activated protein kinase cascade by wortmannin. Dependence on signal strength. *J. Biol. Chem.* **272**(44): 27665-70.
- Ducruzeau, P. H., N. Perretti, M. Laville, F. Andreelli, N. Vega, J. P. Riou and H. Vidal (2001). Regulation by insulin of gene expression in human skeletal muscle and adipose tissue. Evidence for specific defects in type 2 diabetes. *Diabetes* **50**(5): 1134-42.
- Dudek, S. M., S. M. Camp, E. T. Chiang, P. A. Singleton, P. V. Usatyuk, Y. Zhao, V. Natarajan and J. G. Garcia (2007). Pulmonary endothelial cell barrier enhancement by FTY720 does not require the S1P1 receptor. *Cell. Signal.* **19**(8): 1754-64.
- Dudzinski, D. M., J. Igarashi, D. Greif and T. Michel (2006). The regulation and pharmacology of endothelial nitric oxide synthase. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **46**: 235-76.
- Dummler, B., O. Tschopp, D. Hynx, Z. Z. Yang, S. Dirnhofer and B. A. Hemmings (2006). Life with a single isoform of Akt: mice lacking Akt2 and Akt3 are viable but display impaired glucose homeostasis and growth deficiencies. *Mol. Cell. Biol.* **26**(21): 8042-51.
- Dykxhoorn, D. M., C. D. Novina and P. A. Sharp (2003). Killing the messenger: short RNAs that silence gene expression. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **4**(6): 457-67.
- Elbashir, S. M., W. Lendeckel and T. Tuschl (2001a). RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes Dev.* **15**(2): 188-200.
- Elbashir, S. M., J. Martinez, A. Patkaniowska, W. Lendeckel and T. Tuschl (2001b). Functional anatomy of siRNAs for mediating efficient RNAi in *Drosophila melanogaster* embryo lysate. *EMBO J.* **20**(23): 6877-88.
- Ellis, A. G., M. M. Doherty, F. Walker, J. Weinstock, M. Nerrie, A. Vitali, R. Murphy, T. G. Johns, A. M. Scott, A. Levitzki, G. McLachlan, L. K. Webster, A. W. Burgess and E. C. Nice (2006). Preclinical analysis of the analinoquinazoline AG1478, a specific small molecule inhibitor of EGF receptor tyrosine kinase. *Biochem. Pharmacol.* **71**(10): 1422-34.
- Endo, A., K. Nagashima, H. Kurose, S. Mochizuki, M. Matsuda and N. Mochizuki (2002). Sphingosine 1-phosphate induces membrane ruffling and increases motility of human umbilical vein endothelial cells via vascular endothelial growth factor receptor and CrkII. *J. Biol. Chem.* **277**(26): 23747-54.
- English, D., D. N. Brindley, S. Spiegel and J. G. Garcia (2002). Lipid mediators of angiogenesis and the signalling pathways they initiate. *Biochim. Biophys. Acta* **1582**(1-3): 228-39.

- English, D., Z. Welch, A. T. Kovala, K. Harvey, O. V. Volpert, D. N. Brindley and J. G. Garcia (2000). Sphingosine 1-phosphate released from platelets during clotting accounts for the potent endothelial cell chemotactic activity of blood serum and provides a novel link between hemostasis and angiogenesis. *FASEB J.* **14**(14): 2255-65.
- Enomoto, A., J. Ping and M. Takahashi (2006). Girdin, a novel actin-binding protein, and its family of proteins possess versatile functions in the Akt and Wnt signaling pathways. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1086**: 169-84.
- Fayard, E., L. A. Tintignac, A. Baudry and B. A. Hemmings (2005). Protein kinase B/Akt at a glance. *J. Cell Sci.* **118**(Pt 24): 5675-8.
- Fedorov, Y., E. M. Anderson, A. Birmingham, A. Reynolds, J. Karpilow, K. Robinson, D. Leake, W. S. Marshall and A. Khvorova (2006). Off-target effects by siRNA can induce toxic phenotype. *RNA* **12**(7): 1188-96.
- Ferby, I. M., I. Waga, M. Hoshino, K. Kume and T. Shimizu (1996). Wortmannin inhibits mitogen-activated protein kinase activation by platelet-activating factor through a mechanism independent of p85/p110-type phosphatidylinositol 3-kinase. *J. Biol. Chem.* **271**(20): 11684-8.
- Fieber, C. B., J. Eldridge, T. A. Taha, L. M. Obeid and R. C. Mui-Helmericks (2006). Modulation of total Akt kinase by increased expression of a single isoform: requirement of the sphingosine-1-phosphate receptor, Edg3/S1P3, for the VEGF-dependent expression of Akt3 in primary endothelial cells. *Exp. Cell Res.* **312**(7): 1164-73.
- Fields, T. A. and P. J. Casey (1997). Signalling functions and biochemical properties of pertussis toxin-resistant G-proteins. *Biochem. J.* **321** (Pt 3): 561-71.
- Filippa, N., C. L. Sable, C. Filloux, B. Hemmings and E. Van Obberghen (1999). Mechanism of protein kinase B activation by cyclic AMP-dependent protein kinase. *Mol. Cell. Biol.* **19**(7): 4989-5000.
- Fischer, R., J. Julsgart and M. W. Berchtold (1998). High affinity calmodulin target sequence in the signalling molecule PI 3-kinase. *FEBS Lett.* **425**(1): 175-7.
- Fleming, I., B. Fisslthaler, S. Dimmeler, B. E. Kemp and R. Busse (2001). Phosphorylation of Thr(495) regulates Ca(2+)/calmodulin-dependent endothelial nitric oxide synthase activity. *Circ. Res.* **88**(11): E68-75.
- Förstermann, U. (2006b). Janus-faced role of endothelial NO synthase in vascular disease: uncoupling of oxygen reduction from NO synthesis and its pharmacological reversal. *Biol. Chem.* **387**(12): 1521-33.
- Förstermann, U. and T. Münzel (2006a). Endothelial nitric oxide synthase in vascular disease: from marvel to menace. *Circulation* **113**(13): 1708-14.
- Foster, F. M., C. J. Traer, S. M. Abraham and M. J. Fry (2003). The phosphoinositide (PI) 3-kinase family. *J. Cell Sci.* **116**(Pt 15): 3037-40.
- Foukas, L. C. and P. R. Shepherd (2004). eIF4E binding protein 1 and H-Ras are novel substrates for the protein kinase activity of class-I phosphoinositide 3-kinase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **319**(2): 541-9.

- Franca-Koh, J., Y. Kamimura and P. N. Devreotes (2007). Leading-edge research: PtdIns(3,4,5)P3 and directed migration. *Nat. Cell. Biol.* **9**(1): 15-7.
- Frias, M. A., C. C. Thoreen, J. D. Jaffe, W. Schroder, T. Sculley, S. A. Carr and D. M. Sabatini (2006). mSin1 is necessary for Akt/PKB phosphorylation, and its isoforms define three distinct mTORC2s. *Curr. Biol.* **16**(18): 1865-70.
- Fruman, D. A., R. E. Meyers and L. C. Cantley (1998). Phosphoinositide kinases. *Annu. Rev. Biochem.* **67**: 481-507.
- Fukata, M., M. Nakagawa and K. Kaibuchi (2003). Roles of Rho-family GTPases in cell polarisation and directional migration. *Curr. Opin. Cell Biol.* **15**(5): 590-7.
- Gao, Y., J. B. Dickerson, F. Guo, J. Zheng and Y. Zheng (2004). Rational design and characterization of a Rac GTPase-specific small molecule inhibitor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**(20): 7618-23.
- Gaßmann, P., A. Enns and J. Haier (2004). Role of tumor cell adhesion and migration in organ-specific metastasis formation. *Onkologie* **27**(6): 577-82.
- Geering, B., P. R. Cutillas, G. Nock, S. I. Gharbi and B. Vanhaesebroeck (2007). Class IA phosphoinositide 3-kinases are obligate p85-p110 heterodimers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**(19): 7809-14.
- Go, Y. M., H. Park, M. C. Maland, V. M. Darley-USmar, B. Stoyanov, R. Wetzker and H. Jo (1998). Phosphatidylinositol 3-kinase gamma mediates shear stress-dependent activation of JNK in endothelial cells. *Am. J. Physiol.* **275**(5 Pt 2): H1898-904.
- Gonzalez, E., R. Kou and T. Michel (2006). Rac1 modulates sphingosine 1-phosphate-mediated activation of phosphoinositide 3-kinase/Akt signaling pathways in vascular endothelial cells. *J. Biol. Chem.* **281**(6): 3210-6.
- Gorren, A. C. and B. Mayer (2007). Nitric-oxide synthase: a cytochrome P450 family foster child. *Biochim. Biophys. Acta* **1770**(3): 432-45.
- Gregg, D., F. M. Rauscher and P. J. Goldschmidt-Clermont (2003). Rac regulates cardiovascular superoxide through diverse molecular interactions: more than a binary GTP switch. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **285**(4): C723-34.
- Grkovich, A., C. A. Johnson, M. W. Buczynski and E. A. Dennis (2006). Lipopolysaccharide-induced cyclooxygenase-2 expression in human U937 macrophages is phosphatidic acid phosphohydrolase-1-dependent. *J. Biol. Chem.* **281**(44): 32978-87.
- Hait, N. C., C. A. Oskeritzian, S. W. Paugh, S. Milstien and S. Spiegel (2006). Sphingosine kinases, sphingosine 1-phosphate, apoptosis and diseases. *Biochim. Biophys. Acta* **1758**(12): 2016-26.
- Hawes, B. E., L. M. Luttrell, T. van Biesen and R. J. Lefkowitz (1996). Phosphatidylinositol 3-kinase is an early intermediate in the G beta gamma-mediated mitogen-activated protein kinase signaling pathway. *J. Biol. Chem.* **271**(21): 12133-6.

- Hawkins, P. T., K. E. Anderson, K. Davidson and L. R. Stephens (2006). Signalling through Class I PI3Ks in mammalian cells. *Biochem. Soc. Trans.* **34**(Pt 5): 647-62.
- Heron-Milhavet, L., C. Franckhauser, V. Rana, C. Berthenet, D. Fisher, B. A. Hemmings, A. Fernandez and N. J. Lamb (2006). Only Akt1 is required for proliferation, while Akt2 promotes cell cycle exit through p21 binding. *Mol. Cell. Biol.* **26**(22): 8267-80.
- Hla, T. and T. Maciag (1990). An abundant transcript induced in differentiating human endothelial cells encodes a polypeptide with structural similarities to G-protein-coupled receptors. *J. Biol. Chem.* **265**(16): 9308-13.
- Hresko, R. C. and M. Mueckler (2005). mTOR.RICTOR is the Ser473 kinase for Akt/protein kinase B in 3T3-L1 adipocytes. *J. Biol. Chem.* **280**(49): 40406-16.
- Hsieh, A. C., R. Bo, J. Manola, F. Vazquez, O. Bare, A. Khvorova, S. Scaringe and W. R. Sellers (2004). A library of siRNA duplexes targeting the phosphoinositide 3-kinase pathway: determinants of gene silencing for use in cell-based screens. *Nucleic Acids Res.* **32**(3): 893-901.
- Huang, C., K. Jacobson and M. D. Schaller (2004). MAP kinases and cell migration. *J. Cell Sci.* **117**(Pt 20): 4619-28.
- Hudmon, A. and H. Schulman (2002). Structure-function of the multifunctional Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II. *Biochem. J.* **364**(Pt 3): 593-611.
- Igarashi, J., S. G. Bernier and T. Michel (2001). Sphingosine 1-phosphate and activation of endothelial nitric-oxide synthase. differential regulation of Akt and MAP kinase pathways by EDG and bradykinin receptors in vascular endothelial cells. *J. Biol. Chem.* **276**(15): 12420-6.
- Igarashi, J. and T. Michel (2001). Sphingosine 1-phosphate and isoform-specific activation of phosphoinositide 3-kinase beta. Evidence for divergence and convergence of receptor-regulated endothelial nitric-oxide synthase signaling pathways. *J. Biol. Chem.* **276**(39): 36281-8.
- Itagaki, K., J. K. Yun, J. A. Hengst, A. Yatani, C. J. Hauser, Z. Spolarics and E. A. Deitch (2007). Sphingosine 1-phosphate has dual functions in the regulation of endothelial cell permeability and Ca²⁺ metabolism. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **323**(1): 186-91.
- Jackson, A. L., J. Burchard, D. Leake, A. Reynolds, J. Schelter, J. Guo, J. M. Johnson, L. Lim, J. Karpilow, K. Nichols, W. Marshall, A. Khvorova and P. S. Linsley (2006). Position-specific chemical modification of siRNAs reduces "off-target" transcript silencing. *RNA* **12**(7): 1197-205.
- Jackson, A. L. and P. S. Linsley (2004). Noise amidst the silence: off-target effects of siRNAs? *Trends Genet.* **20**(11): 521-4.
- Jackson, J. R., M. P. Seed, C. H. Kircher, D. A. Willoughby and J. D. Winkler (1997). The codependence of angiogenesis and chronic inflammation. *FASEB J.* **11**(6): 457-65.

- Jaffe, A. B. and A. Hall (2005). Rho GTPases: biochemistry and biology. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **21**: 247-69.
- Joyal, J. L., D. J. Burks, S. Pons, W. F. Matter, C. J. Vlahos, M. F. White and D. B. Sacks (1997). Calmodulin activates phosphatidylinositol 3-kinase. *J. Biol. Chem.* **272**(45): 28183-6.
- Kandel, E. S. and N. Hay (1999). The regulation and activities of the multifunctional serine/threonine kinase Akt/PKB. *Exp. Cell Res.* **253**(1): 210-29.
- Katkade, V., A. A. Soyombo, I. Isordia-Salas, H. N. Bradford, J. P. Gaughan, R. W. Colman and T. S. Panetti (2005). Domain 5 of cleaved high molecular weight kininogen inhibits endothelial cell migration through Akt. *Thromb. Haemost.* **94**(3): 606-14.
- Kim, D. H. and J. J. Rossi (2007). Strategies for silencing human disease using RNA interference. *Nat. Rev. Genet.* **8**(3): 173-84.
- Kim, J. H., W. K. Song and J. S. Chun (2000). Sphingosine 1-phosphate activates Erk-1/-2 by transactivating epidermal growth factor receptor in rat-2 cells. *IUBMB Life* **50**(2): 119-24.
- Kim, K. M., P. K. Kim, Y. G. Kwon, S. K. Bai, W. D. Nam and Y. M. Kim (2002). Regulation of apoptosis by nitrosative stress. *J. Biochem. Mol. Biol.* **35**(1): 127-33.
- Kimura, T., K. Sato, A. Kuwabara, H. Tomura, M. Ishiware, I. Kobayashi, M. Ui and F. Okajima (2001). Sphingosine 1-phosphate may be a major component of plasma lipoproteins responsible for the cytoprotective actions in human umbilical vein endothelial cells. *J. Biol. Chem.* **276**(34): 31780-5.
- Kimura, T., T. Watanabe, K. Sato, J. Kon, H. Tomura, K. Tamama, A. Kuwabara, T. Kanda, I. Kobayashi, H. Ohta, M. Ui and F. Okajima (2000). Sphingosine 1-phosphate stimulates proliferation and migration of human endothelial cells possibly through the lipid receptors, Edg-1 and Edg-3. *Biochem. J.* **348 Pt 1**: 71-6.
- Kluk, M. J. and T. Hla (2002). Signaling of sphingosine-1-phosphate via the S1P/EDG-family of G-protein-coupled receptors. *Biochim. Biophys. Acta* **1582**(1-3): 72-80.
- Kranenburg, O. and W. H. Moolenaar (2001). Ras-MAP kinase signaling by lysophosphatidic acid and other G protein-coupled receptor agonists. *Oncogene* **20**(13): 1540-6.
- Krens, S. F., H. P. Spaik and B. E. Snijder-Jagalska (2006). Functions of the MAPK family in vertebrate-development. *FEBS Lett.* **580**(21): 4984-90.
- Krump-Konvalinkova, V., S. Yasuda, T. Rubic, N. Makarova, J. Mages, W. Erl, C. Vosseler, C. J. Kirkpatrick, G. Tigyi and W. Siess (2005). Stable knock-down of the sphingosine 1-phosphate receptor S1P1 influences multiple functions of human endothelial cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **25**(3): 546-52.
- Lamallice, L., F. Le Boeuf and J. Huot (2007). Endothelial cell migration during angiogenesis. *Circ. Res.* **100**(6): 782-94.

- Le Clairche, C. and M. F. Carlier (2008). Regulation of actin assembly associated with protrusion and adhesion in cell migration. *Physiol. Rev.* **88**(2): 489-513.
- Le Good, J. A., W. H. Ziegler, D. B. Parekh, D. R. Alessi, P. Cohen and P. J. Parker (1998). Protein kinase C isotypes controlled by phosphoinositide 3-kinase through the protein kinase PDK1. *Science* **281**(5385): 2042-5.
- Lee, H., E. J. Goetzel and S. An (2000). Lysophosphatidic acid and sphingosine 1-phosphate stimulate endothelial cell wound healing. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **278**(3): C612-8.
- Lee, J. F., Q. Zeng, H. Ozaki, L. Wang, A. R. Hand, T. Hla, E. Wang and M. J. Lee (2006). Dual roles of tight junction-associated protein, zonula occludens-1, in sphingosine 1-phosphate-mediated endothelial chemotaxis and barrier integrity. *J. Biol. Chem.* **281**(39): 29190-200.
- Lee, M. J., S. Thangada, K. P. Claffey, N. Ancellin, C. H. Liu, M. Kluk, M. Volpi, R. I. Sha'afi and T. Hla (1999). Vascular endothelial cell adherens junction assembly and morphogenesis induced by sphingosine-1-phosphate. *Cell* **99**(3): 301-12.
- Lee, M. J., S. Thangada, J. H. Paik, G. P. Sapkota, N. Ancellin, S. S. Chae, M. Wu, M. Morales-Ruiz, W. C. Sessa, D. R. Alessi and T. Hla (2001). Akt-mediated phosphorylation of the G protein-coupled receptor EDG-1 is required for endothelial cell chemotaxis. *Mol. Cell* **8**(3): 693-704.
- Levine, Y. C., G. K. Li and T. Michel (2007). Agonist-modulated regulation of AMP-activated protein kinase (AMPK) in endothelial cells. Evidence for an AMPK -> Rac1 -> Akt -> endothelial nitric-oxide synthase pathway. *J. Biol. Chem.* **282**(28): 20351-64.
- Li, L. X., P. E. MacDonald, D. S. Ahn, G. Y. Oudit, P. H. Backx and P. L. Brubaker (2006). Role of phosphatidylinositol 3-kinase γ in the beta-cell: interactions with glucagon-like peptide-1. *Endocrinology* **147**(7): 3318-25.
- Li, Z., J. H. Paik, Z. Wang, T. Hla and D. Wu (2005). Role of guanine nucleotide exchange factor P-Rex-2b in sphingosine 1-phosphate-induced Rac1 activation and cell migration in endothelial cells. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* **76**(1-4): 95-104.
- Lin, C. I., C. N. Chen, P. W. Lin and H. Lee (2007). Sphingosine 1-phosphate regulates inflammation-related genes in human endothelial cells through S1P1 and S1P3. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **355**(4): 895-901.
- Lin, X., X. Ruan, M. G. Anderson, J. A. McDowell, P. E. Kroeger, S. W. Fesik and Y. Shen (2005). siRNA-mediated off-target gene silencing triggered by a 7 nt complementation. *Nucleic Acids Res.* **33**(14): 4527-35.
- Linder, M. E. and R. J. Deschenes (2007). Palmitoylation: policing protein stability and traffic. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **8**(1): 74-84.
- Liu, Y., N. Jiang, J. Wu, W. Dai and J. S. Rosenblum (2007). Polo-like kinases inhibited by wortmannin. Labeling site and downstream effects. *J. Biol. Chem.* **282**(4): 2505-11.
- Lloyd, A. C. (2006). Distinct functions for ERKs? *J. Biol.* **5**(5): 13.

- Lopez-Illasaca, M., P. Crespo, P. G. Pellici, J. S. Gutkind and R. Wetzker (1997). Linkage of G protein-coupled receptors to the MAPK signaling pathway through PI 3-kinase gamma. *Science* **275**(5298): 394-7.
- Ma, W., S. Mishra, K. Gee, J. P. Mishra, D. Nandan, N. E. Reiner, J. B. Angel and A. Kumar (2007). Cyclosporin A and FK506 inhibit IL-12p40 production through the calmodulin/calmodulin-dependent protein kinase-activated phosphoinositide 3-kinase in lipopolysaccharide-stimulated human monocytic cells. *J. Biol. Chem.* **282**(18): 13351-62.
- Maehama, T. and J. E. Dixon (1998). The tumor suppressor, PTEN/MMAC1, dephosphorylates the lipid second messenger, phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate. *J. Biol. Chem.* **273**(22): 13375-8.
- Maier, U., A. Babich and B. Nurnberg (1999). Roles of non-catalytic subunits in gbetagamma-induced activation of class I phosphoinositide 3-kinase isoforms beta and gamma. *J. Biol. Chem.* **274**(41): 29311-7.
- Martelli, A. M., I. Faenza, A. M. Billi, L. Manzoli, C. Evangelisti, F. Fala and L. Cocco (2006). Intranuclear 3'-phosphoinositide metabolism and Akt signaling: new mechanisms for tumorigenesis and protection against apoptosis? *Cell. Signal.* **18**(8): 1101-7.
- Martins, G. G. and J. Kolega (2006). Endothelial cell protrusion and migration in three-dimensional collagen matrices. *Cell Motil. Cytoskeleton* **63**(2): 101-15.
- Mathers, C. D. and D. Loncar (2006). Projections of global mortality and burden of disease from 2002 to 2030. *PLoS Med* **3**(11): e442.
- Matveeva, O., Y. Nechipurenko, L. Rossi, B. Moore, P. Sætrom, A. Y. Ogurtsov, J. F. Atkins and S. A. Shabalina (2007). Comparison of approaches for rational siRNA design leading to a new efficient and transparent method. *Nucleic Acids Res.* **35**(8): e63.
- McCarty, O. J., M. K. Larson, J. M. Auger, N. Kalia, B. T. Atkinson, A. C. Pearce, S. Ruf, R. B. Henderson, V. L. Tybulewicz, L. M. Machesky and S. P. Watson (2005). Rac1 is essential for platelet lamellipodia formation and aggregate stability under flow. *J. Biol. Chem.* **280**(47): 39474-84.
- Meister, G., M. Landthaler, A. Patkaniowska, Y. Dorsett, G. Teng and T. Tuschl (2004). Human Argonaute2 mediates RNA cleavage targeted by miRNAs and siRNAs. *Mol. Cell* **15**(2): 185-97.
- Menard, R. E. and R. R. Mattingly (2004). Gbetagamma subunits stimulate p21-activated kinase 1 (PAK1) through activation of PI3-kinase and Akt but act independently of Rac1/Cdc42. *FEBS Lett.* **556**(1-3): 187-92.
- Meyer zu Heringdorf, D., K. Liliom, M. Schaefer, K. Danneberg, J. H. Jaggar, G. Tigyi and K. H. Jakobs (2003). Photolysis of intracellular caged sphingosine-1-phosphate causes Ca²⁺ mobilization independently of G-protein-coupled receptors. *FEBS Lett.* **554**(3): 443-9.
- Miura, S., H. Tanigawa, Y. Matsuo, M. Fujino, A. Kawamura and K. Saku (2003). Ras/Raf1-dependent signal in sphingosine-1-phosphate-induced tube formation in

- human coronary artery endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **306**(4): 924-9.
- Moldovan, L., K. Myhre, P. J. Goldschmidt-Clermont and L. L. Satterwhite (2006). Reactive oxygen species in vascular endothelial cell motility. Roles of NAD(P)H oxidase and Rac1. *Cardiovasc. Res.* **71**(2): 236-46.
- Morales-Ruiz, M., D. Fulton, G. Sowa, L. R. Languino, Y. Fujio, K. Walsh and W. C. Sessa (2000). Vascular endothelial growth factor-stimulated actin reorganization and migration of endothelial cells is regulated via the serine/threonine kinase Akt. *Circ. Res.* **86**(8): 892-6.
- Morales-Ruiz, M., M. J. Lee, S. Zollner, J. P. Gratton, R. Scotland, I. Shiojima, K. Walsh, T. Hla and W. C. Sessa (2001). Sphingosine 1-phosphate activates Akt, nitric oxide production, and chemotaxis through a Gi protein/phosphoinositide 3-kinase pathway in endothelial cells. *J. Biol. Chem.* **276**(22): 19672-7.
- Moroz, L. L., S. W. Norby, L. Cruz, J. V. Sweedler, R. Gillette and R. B. Clarkson (1998). Non-enzymatic production of nitric oxide (NO) from NO synthase inhibitors. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **253**(3): 571-6.
- Mount, P. F., B. E. Kemp and D. A. Power (2007). Regulation of endothelial and myocardial NO synthesis by multi-site eNOS phosphorylation. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **42**(2): 271-9.
- Mungrue, I. N., D. S. Bredt, D. J. Stewart and M. Husain (2003). From molecules to mammals: what's NOS got to do with it? *Acta Physiol. Scand.* **179**(2): 123-35.
- Muñoz-Chápuli, R., A. R. Quesada and M. Angel Medina (2004). Angiogenesis and signal transduction in endothelial cells. *Cell. Mol. Life Sci.* **61**(17): 2224-43.
- Murga, C., S. Fukuhara and J. S. Gutkind (2000). A novel role for phosphatidylinositol 3-kinase beta in signaling from G protein-coupled receptors to Akt. *J. Biol. Chem.* **275**(16): 12069-73.
- Murohara, T., B. Witzenbichler, I. Spyridopoulos, T. Asahara, B. Ding, A. Sullivan, D. W. Losordo and J. M. Isner (1999). Role of endothelial nitric oxide synthase in endothelial cell migration. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **19**(5): 1156-61.
- Naga Prasad, S. V., A. Jayatilleke, A. Madamanchi and H. A. Rockman (2005). Protein kinase activity of phosphoinositide 3-kinase regulates beta-adrenergic receptor endocytosis. *Nat. Cell. Biol.* **7**(8): 785-96.
- Nakatani, K., H. Sakaue, D. A. Thompson, R. J. Weigel and R. A. Roth (1999). Identification of a human Akt3 (protein kinase B gamma) which contains the regulatory serine phosphorylation site. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **257**(3): 906-10.
- Nguyen, L. T., K. Atobe, J. M. Barichello, T. Ishida and H. Kiwada (2007). Complex formation with plasmid DNA increases the cytotoxicity of cationic liposomes. *Biol. Pharm. Bull.* **30**(4): 751-7.
- Nishio, M., K. Watanabe, J. Sasaki, C. Taya, S. Takasuga, R. Iizuka, T. Balla, M. Yamazaki, H. Watanabe, R. Itoh, S. Kuroda, Y. Horie, I. Forster, T. W. Mak, H. Yonekawa, J. M. Penninger, Y. Kanaho, A. Suzuki and T. Sasaki (2007). Control

- of cell polarity and motility by the PtdIns(3,4,5)P₃ phosphatase SHIP1. *Nat. Cell. Biol.* **9**(1): 36-44.
- Noiri, E., Y. Hu, W. F. Bahou, C. R. Keese, I. Giaever and M. S. Goligorsky (1997). Permissive role of nitric oxide in endothelin-induced migration of endothelial cells. *J. Biol. Chem.* **272**(3): 1747-52.
- Pacher, P., J. S. Beckman and L. Liaudet (2007). Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiol. Rev.* **87**(1): 315-424.
- Parker, J. S. and D. Barford (2006). Argonaute: A scaffold for the function of short regulatory RNAs. *Trends Biochem. Sci.* **31**(11): 622-30.
- Pérez-García, M. J., V. Ceña, Y. de Pablo, M. Llovera, J. X. Comella and R. M. Soler (2004). Glial cell line-derived neurotrophic factor increases intracellular calcium concentration. Role of calcium/calmodulin in the activation of the phosphatidylinositol 3-kinase pathway. *J. Biol. Chem.* **279**(7): 6132-42.
- Perry, A. K., G. Chen, D. Zheng, H. Tang and G. Cheng (2005). The host type I interferon response to viral and bacterial infections. *Cell Res.* **15**(6): 407-22.
- Persengiev, S. P., X. Zhu and M. R. Green (2004). Nonspecific, concentration-dependent stimulation and repression of mammalian gene expression by small interfering RNAs (siRNAs). *RNA* **10**(1): 12-8.
- Peterson, G. (1995). Evaluation of the biochemical targets of genistein in tumor cells. *J. Nutr.* **125**(3 Suppl): 784S-789S.
- Pirola, L., M. J. Zvelebil, G. Bulgarelli-Leva, E. Van Obberghen, M. D. Waterfield and M. P. Wymann (2001). Activation loop sequences confer substrate specificity to phosphoinositide 3-kinase alpha (PI3Kalpha). Functions of lipid kinase-deficient PI3Kalpha in signaling. *J. Biol. Chem.* **276**(24): 21544-54.
- Pollock, J. S., U. Forstermann, J. A. Mitchell, T. D. Warner, H. H. Schmidt, M. Nakane and F. Murad (1991). Purification and characterization of particulate endothelium-derived relaxing factor synthase from cultured and native bovine aortic endothelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **88**(23): 10480-4.
- Price, L. S., M. Langeslag, J. P. ten Klooster, P. L. Hordijk, K. Jalink and J. G. Collard (2003). Calcium signaling regulates translocation and activation of Rac. *J. Biol. Chem.* **278**(41): 39413-21.
- Primo, L., L. di Blasio, C. Roca, S. Droetto, R. Piva, B. Schaffhausen and F. Bussolino (2007). Essential role of PDK1 in regulating endothelial cell migration. *J. Cell Biol.* **176**(7): 1035-47.
- Pugazhenth, S., A. Nesterova, C. Sable, K. A. Heidenreich, L. M. Boxer, L. E. Heasley and J. E. Reusch (2000). Akt/protein kinase B up-regulates Bcl-2 expression through cAMP-response element-binding protein. *J. Biol. Chem.* **275**(15): 10761-6.
- Puri, K. D., T. A. Doggett, J. Douangpanya, Y. Hou, W. T. Tino, T. Wilson, T. Graf, E. Clayton, M. Turner, J. S. Hayflick and T. G. Diacovo (2004). Mechanisms and implications of phosphoinositide 3-kinase delta in promoting neutrophil trafficking into inflamed tissue. *Blood* **103**(9): 3448-56.

- Puri, K. D., T. A. Doggett, C. Y. Huang, J. Douangpanya, J. S. Hayflick, M. Turner, J. Penninger and T. G. Diacovo (2005). The role of endothelial PI3Kgamma activity in neutrophil trafficking. *Blood* **106**(1): 150-7.
- Rana, T. M. (2007). Illuminating the silence: understanding the structure and function of small RNAs. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **8**(1): 23-36.
- Reynolds, A., E. M. Anderson, A. Vermeulen, Y. Fedorov, K. Robinson, D. Leake, J. Karpilow, W. S. Marshall and A. Khvorova (2006). Induction of the interferon response by siRNA is cell type- and duplex length-dependent. *RNA* **12**(6): 988-93.
- Reynolds, A., D. Leake, Q. Boese, S. Scaringe, W. S. Marshall and A. Khvorova (2004). Rational siRNA design for RNA interference. *Nat. Biotechnol.* **22**(3): 326-30.
- Ridley, A. J. (2006). Rho GTPases and actin dynamics in membrane protrusions and vesicle trafficking. *Trends Cell Biol.* **16**(10): 522-9.
- Rikitake, Y., K. Hirata, S. Kawashima, M. Ozaki, T. Takahashi, W. Ogawa, N. Inoue and M. Yokoyama (2002). Involvement of endothelial nitric oxide in sphingosine-1-phosphate-induced angiogenesis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **22**(1): 108-14.
- Rodriguez-Viciana, P., C. Sabatier and F. McCormick (2004). Signaling specificity by Ras family GTPases is determined by the full spectrum of effectors they regulate. *Mol. Cell. Biol.* **24**(11): 4943-54.
- Rosen, H., M. G. Sanna, S. M. Cahalan and P. J. Gonzalez-Cabrera (2007). Tipping the gatekeeper: S1P regulation of endothelial barrier function. *Trends Immunol* **28**(3): 102-7.
- Roux, P. P. and J. Blenis (2004). ERK and p38 MAPK-activated protein kinases: a family of protein kinases with diverse biological functions. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **68**(2): 320-44.
- Rubio, I., P. Rodriguez-Viciana, J. Downward and R. Wetzker (1997). Interaction of Ras with phosphoinositide 3-kinase gamma. *Biochem. J.* **326** (Pt 3): 891-5.
- Rubio, I., U. Wittig, C. Meyer, R. Heinze, D. Kadereit, H. Waldmann, J. Downward and R. Wetzker (1999). Farnesylation of Ras is important for the interaction with phosphoinositide 3-kinase gamma. *Eur. J. Biochem.* **266**(1): 70-82.
- Sarbassov, D. D., D. A. Guertin, S. M. Ali and D. M. Sabatini (2005). Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science* **307**(5712): 1098-101.
- Scheid, M. P., M. Huber, J. E. Damen, M. Hughes, V. Kang, P. Neilsen, G. D. Prestwich, G. Krystal and V. Duronio (2002a). Phosphatidylinositol (3,4,5)P3 is essential but not sufficient for protein kinase B (PKB) activation; phosphatidylinositol (3,4)P2 is required for PKB phosphorylation at Ser-473: studies using cells from SH2-containing inositol-5-phosphatase knockout mice. *J. Biol. Chem.* **277**(11): 9027-35.

- Scheid, M. P., P. A. Marignani and J. R. Woodgett (2002b). Multiple phosphoinositide 3-kinase-dependent steps in activation of protein kinase B. *Mol. Cell. Biol.* **22**(17): 6247-60.
- Scherr, M. and M. Eder (2007). Gene silencing by small regulatory RNAs in mammalian cells. *Cell Cycle* **6**(4): 444-9.
- Schmidt, A. and A. Hall (2002). Guanine nucleotide exchange factors for Rho GTPases: turning on the switch. *Genes Dev.* **16**(13): 1587-609.
- Schönwasser, D. C., R. M. Marais, C. J. Marshall and P. J. Parker (1998). Activation of the mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase pathway by conventional, novel, and atypical protein kinase C isotypes. *Mol. Cell. Biol.* **18**(2): 790-8.
- Settleman, J. (2007). PAK-in' up cGMP for the move. *Cell* **128**(2): 237-8.
- Shi, F., A. Nomden, V. Oberle, J. B. Engberts and D. Hoekstra (2001). Efficient cationic lipid-mediated delivery of antisense oligonucleotides into eukaryotic cells: down-regulation of the corticotropin-releasing factor receptor. *Nucleic Acids Res.* **29**(10): 2079-87.
- Shiojima, I. and K. Walsh (2002). Role of Akt signaling in vascular homeostasis and angiogenesis. *Circ. Res.* **90**(12): 1243-50.
- Siegrist, S. E. and C. Q. Doe (2007). Microtubule-induced cortical cell polarity. *Genes Dev.* **21**(5): 483-96.
- Singleton, P. A., S. M. Dudek, E. T. Chiang and J. G. N. Garcia (2005). Regulation of sphingosine 1-phosphate-induced endothelial cytoskeletal rearrangement and barrier enhancement by S1P1 receptor, PI3 kinase, Tiam1/Rac1, and alpha-actinin. *FASEB J.* **19**(12): 1646-56.
- Smisterova, J., A. Wagenaar, M. C. Stuart, E. Polushkin, G. ten Brinke, R. Hulst, J. B. Engberts and D. Hoekstra (2001). Molecular shape of the cationic lipid controls the structure of cationic lipid/dioleoylphosphatidylethanolamine-DNA complexes and the efficiency of gene delivery. *J. Biol. Chem.* **276**(50): 47615-22.
- Snøve, O., Jr. and T. Holen (2004). Many commonly used siRNAs risk off-target activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **319**(1): 256-63.
- Spagnou, S., A. D. Miller and M. Keller (2004). Lipidic carriers of siRNA: differences in the formulation, cellular uptake, and delivery with plasmid DNA. *Biochemistry (Mosc.)* **43**(42): 13348-56.
- Spiegel, S. and S. Milstien (2003). Sphingosine-1-phosphate: an enigmatic signalling lipid. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **4**(5): 397-407.
- Spiekermann, K., R. J. Dirschinger, R. Schwab, K. Bagrintseva, F. Faber, C. Buske, S. Schnittger, L. M. Kelly, D. G. Gilliland and W. Hiddemann (2003). The protein tyrosine kinase inhibitor SU5614 inhibits FLT3 and induces growth arrest and apoptosis in AML-derived cell lines expressing a constitutively activated FLT3. *Blood* **101**(4): 1494-504.

- Staal, S. P. (1987). Molecular cloning of the akt oncogene and its human homologues AKT1 and AKT2: amplification of AKT1 in a primary human gastric adenocarcinoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **84**(14): 5034-7.
- Stambolic, V. and J. R. Woodgett (2006). Functional distinctions of protein kinase B/Akt isoforms defined by their influence on cell migration. *Trends Cell Biol.* **16**(9): 461-6.
- Stephens, L. R., A. Eguinoa, H. Erdjument-Bromage, M. Lui, F. Cooke, J. Coadwell, A. S. Smrcka, M. Thelen, K. Cadwallader, P. Tempst and P. T. Hawkins (1997). The G beta gamma sensitivity of a PI3K is dependent upon a tightly associated adaptor, p101. *Cell* **89**(1): 105-14.
- Stoyanov, B., S. Volinia, T. Hanck, I. Rubio, M. Loubtchenkov, D. Malek, S. Stoyanova, B. Vanhaesebroeck, R. Dhand, B. Nurnberg and et al. (1995). Cloning and characterization of a G protein-activated human phosphoinositide-3 kinase. *Science* **269**(5224): 690-3.
- Suire, S., J. Coadwell, G. J. Ferguson, K. Davidson, P. Hawkins and L. Stephens (2005). p84, a new Gbetagamma-activated regulatory subunit of the type IB phosphoinositide 3-kinase p110gamma. *Curr. Biol.* **15**(6): 566-70.
- Sun, L., N. Tran, F. Tang, H. App, P. Hirth, G. McMahon and C. Tang (1998). Synthesis and biological evaluations of 3-substituted indolin-2-ones: a novel class of tyrosine kinase inhibitors that exhibit selectivity toward particular receptor tyrosine kinases. *J. Med. Chem.* **41**(14): 2588-603.
- Takahashi, Y., K. Yamaoka, M. Nishikawa and Y. Takakura (2006). Moment analysis for kinetics of gene silencing by RNA interference. *Biotechnol. Bioeng.* **93**(4): 816-9.
- Takuwa, Y. (2002). Subtype-specific differential regulation of Rho family G proteins and cell migration by the Edg family sphingosine-1-phosphate receptors. *Biochim. Biophys. Acta* **1582**(1-3): 112-20.
- Tani, M., M. Ito and Y. Igarashi (2007). Ceramide/sphingosine/sphingosine 1-phosphate metabolism on the cell surface and in the extracellular space. *Cell. Signal.* **19**(2): 229-37.
- Tanimoto, T., Z. G. Jin and B. C. Berk (2002). Transactivation of vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor Flk-1/KDR is involved in sphingosine 1-phosphate-stimulated phosphorylation of Akt and endothelial nitric-oxide synthase (eNOS). *J. Biol. Chem.* **277**(45): 42997-3001.
- Thompson, J. F., L. S. Hayes and D. B. Lloyd (1991). Modulation of firefly luciferase stability and impact on studies of gene regulation. *Gene* **103**(2): 171-7.
- Traer, C. J., F. M. Foster, S. M. Abraham and M. J. Fry (2006). Are class II phosphoinositide 3-kinases potential targets for anticancer therapies? *Bull. Cancer* **93**(5): E53-8.
- Ueda, Y., S. Hirai, S. Osada, A. Suzuki, K. Mizuno and S. Ohno (1996). Protein kinase C activates the MEK-ERK pathway in a manner independent of Ras and dependent on Raf. *J. Biol. Chem.* **271**(38): 23512-9.

- Ueki, K., S. Matsuda, K. Tobe, Y. Gotoh, H. Tamemoto, M. Yachi, Y. Akanuma, Y. Yazaki, E. Nishida and T. Kadowaki (1994). Feedback regulation of mitogen-activated protein kinase kinase activity of c-Raf-1 by insulin and phorbol ester stimulation. *J. Biol. Chem.* **269**(22): 15756-61.
- Ui-Tei, K., Y. Naito, F. Takahashi, T. Haraguchi, H. Ohki-Hamazaki, A. Juni, R. Ueda and K. Saigo (2004). Guidelines for the selection of highly effective siRNA sequences for mammalian and chick RNA interference. *Nucleic Acids Res.* **32**(3): 936-48.
- Van Brocklyn, J. R., B. Behbahani and N. H. Lee (2002). Homodimerization and heterodimerization of S1P/EDG sphingosine-1-phosphate receptors. *Biochim. Biophys. Acta* **1582**(1-3): 89-93.
- van der Woude, I., A. Wagenaar, A. A. Meekel, M. B. ter Beest, M. H. Ruiters, J. B. Engberts and D. Hoekstra (1997). Novel pyridinium surfactants for efficient, nontoxic in vitro gene delivery. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **94**(4): 1160-5.
- Vanhaesebroeck, B., S. J. Leever, K. Ahmadi, J. Timms, R. Katso, P. C. Driscoll, R. Woscholski, P. J. Parker and M. D. Waterfield (2001). Synthesis and function of 3-phosphorylated inositol lipids. *Annu. Rev. Biochem.* **70**: 535-602.
- Vanhaesebroeck, B., M. J. Welham, K. Kotani, R. Stein, P. H. Warne, M. J. Zvelebil, K. Higashi, S. Volinia, J. Downward and M. D. Waterfield (1997). P110delta, a novel phosphoinositide 3-kinase in leukocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **94**(9): 4330-5.
- Visentin, B., J. A. Vekich, B. J. Sibbald, A. L. Cavalli, K. M. Moreno, R. G. Matteo, W. A. Garland, Y. Lu, S. Yu, H. S. Hall, V. Kundra, G. B. Mills and R. A. Sabbadini (2006). Validation of an anti-sphingosine-1-phosphate antibody as a potential therapeutic in reducing growth, invasion, and angiogenesis in multiple tumor lineages.[see comment]. *Cancer Cell* **9**(3): 225-38.
- Voigt, P., M. B. Dorner and M. Schaefer (2006). Characterization of p87PIKAP, a novel regulatory subunit of phosphoinositide 3-kinase gamma that is highly expressed in heart and interacts with PDE3B. *J. Biol. Chem.* **281**(15): 9977-86.
- Watanabe, T., J. Noritake and K. Kaibuchi (2005). Regulation of microtubules in cell migration. *Trends Cell Biol.* **15**(2): 76-83.
- Wennström, S. and J. Downward (1999). Role of phosphoinositide 3-kinase in activation of ras and mitogen-activated protein kinase by epidermal growth factor. *Mol. Cell. Biol.* **19**(6): 4279-88.
- Werry, T. D., P. M. Sexton and A. Christopoulos (2005). "Ins and outs" of seven-transmembrane receptor signalling to ERK. *Trends Endocrinol. Metab.* **16**(1): 26-33.
- Wetzker, R. and F. D. Böhmer (2003). Transactivation joins multiple tracks to the ERK/MAPK cascade. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **4**(8): 651-7.
- Williams, M. R., J. S. Arthur, A. Balendran, J. van der Kaay, V. Poli, P. Cohen and D. R. Alessi (2000). The role of 3-phosphoinositide-dependent protein kinase 1 in activating AGC kinases defined in embryonic stem cells. *Curr. Biol.* **10**(8): 439-48.

- Windh, R. T., M. J. Lee, T. Hla, S. An, A. J. Barr and D. R. Manning (1999). Differential coupling of the sphingosine 1-phosphate receptors Edg-1, Edg-3, and H218/Edg-5 to the G(i), G(q), and G(12) families of heterotrimeric G proteins. *J. Biol. Chem.* **274**(39): 27351-8.
- Wu, W. T., C. N. Chen, C. I. Lin, J. H. Chen and H. Lee (2005). Lysophospholipids enhance matrix metalloproteinase-2 expression in human endothelial cells. *Endocrinology* **146**(8): 3387-400.
- Wymann, M. P., G. Bulgarelli-Leva, M. J. Zvelebil, L. Pirola, B. Vanhaesebroeck, M. D. Waterfield and G. Panayotou (1996). Wortmannin inactivates phosphoinositide 3-kinase by covalent modification of Lys-802, a residue involved in the phosphate transfer reaction. *Mol. Cell. Biol.* **16**(4): 1722-33.
- Wymann, M. P. and L. Pirola (1998). Structure and function of phosphoinositide 3-kinases. *Biochim. Biophys. Acta* **1436**(1-2): 127-50.
- Wymann, M. P., M. Zvelebil and M. Laffargue (2003). Phosphoinositide 3-kinase signalling--which way to target? *Trends Pharmacol. Sci.* **24**(7): 366-76.
- Xu, J., Q. G. Zhang, C. Li and G. Y. Zhang (2007). Subtoxic N-methyl-D-aspartate delayed neuronal death in ischemic brain injury through TrkB receptor- and calmodulin-mediated PI-3K/Akt pathway activation. *Hippocampus* **17**(7): 525-37.
- Yoon, S. and R. Seger (2006). The extracellular signal-regulated kinase: multiple substrates regulate diverse cellular functions. *Growth Factors* **24**(1): 21-44.
- Yuan, B., R. Latek, M. Hossbach, T. Tuschl and F. Lewitter (2004). siRNA Selection Server: an automated siRNA oligonucleotide prediction server. *Nucleic Acids Res.* **32**(Web Server issue): W130-4.
- Zheng, Y., S. Bagrodia and R. A. Cerione (1994). Activation of phosphoinositide 3-kinase activity by Cdc42Hs binding to p85. *J. Biol. Chem.* **269**(29): 18727-30.

6 Anhang

6.1 Abkürzungen

4EBP-1	<i>eukaryotic initiation factor 4E-binding protein 1</i>
ACAP1	<i>ADP-ribosylation factor directed GAP with coiled-coil domains, ANKs and PH domains 1</i>
Ago	<i>Argonaute</i>
Akt	humanes Homologon zum viralen Onkogen des Akt-8-Virus
AMPK	<i>AMP-activated protein kinases</i>
Arp2/3	<i>actin-related protein 2/3</i>
Bad	<i>Bcl-2-associated death promoter</i>
BAEC	<i>bovine aortic endothelial cells</i>
Bcl-2	<i>B-cell lymphoma 2</i>
bFGF	<i>basic Fibroblast Growth Factor</i>
Bim	<i>Bcl-2 interacting mediator of cell death</i>
CaM	<i>Ca²⁺/calmodulin</i>
CaMKII	<i>Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II</i>
CaM-KK	<i>Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase kinase</i>
Caspase-9	<i>cysteine protease with aspartate specificity 9</i>
Cdc42	<i>cell division cycle 42</i>
cGMP	<i>cyclic guanosine monophosphate</i>
c-Myc	<i>cellular homologue of avian myelocytomatosis virus oncogene</i>
CREB	<i>cAMP-response element-binding protein</i>
CRIB	<i>Cdc42/Rac-interactive binding</i>
EDG-1	<i>endothelial differentiation gene 1</i>
eNOS	<i>endothelial nitric oxide synthase</i>
ERK	extrazellulärsignal-regulierte Kinase
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid
FAK	<i>focal adhesion kinase</i>
FMN	Flavin-Mononukleotid
FOXO	<i>Forkhead box O</i>
GAPs	<i>GTPase activating proteins</i>
GDI	<i>guanine nucleotide dissociation inhibitors</i>
GDP	Guanosindiphosphat
GEFs	<i>guanine nucleotide exchange factors</i>
G _i	<i>inhibitorische heterotrimere GTP-bindende Proteine</i>

GPCR	<i>G-protein coupled receptor</i>
GTP	G uanosin t riphosphat
Gβγ	βγ-Untereinheiten der heterotrimeren G-Proteine
HAEC	<i>human aortic endothelial cells</i>
Hsp70	<i>heat shock protein 70</i>
HUVEC	<i>human umbilical vein endothelial cells</i>
ICAM-1	<i>intercellular adhesion molecule-1</i>
IQGAP1	<i>IQ motif containing GTPase activating protein 1</i>
IRS-1	<i>insulin receptor substrate-1</i>
IRSp53	<i>insulin receptor tyrosine kinase substrate p53</i>
JNKs	c-JUN-N-Terminus-Kinasen
LIMK	<i>LIM-domain-containing kinase</i>
MAPKK	MAPK-Kinase
MAPKKK	MAPK-Kinase-Kinase
MAPKs	Mitogen-aktivierte Proteinkinasen
MCP-1	<i>monocyte chemotactic protein-1</i>
MEK1/2	MAPK-ERK1/2-Kinase 1 und 2
miRNA	<i>micro RNA</i>
MLCK	<i>myosin light chain kinase</i>
mRNA	<i>messenger RNA</i>
mTOR	<i>mammalian target of rapamycin</i>
mTORC2	<i>mammalian target of rapamycin complex 2</i>
NADPH	Nikotinamid-Adenin-Dinukleotidphosphat
NF-κB	<i>nuclear factor of immunoglobulin κ locus in B cells</i>
NOXA1	<i>NAD(P)H oxidase activating protein 1</i>
NOXO1	<i>NAD(P)H oxidase organizing protein 1</i>
p140Sra1	<i>Specifically Rac1-associated protein 1</i>
PAF	Plättchenaktivierender Faktor
PAK	<i>p21-activated kinase</i>
PAZ	<i>Piwi/Argonaute/Zwille</i>
PDGF	<i>platelet-derived growth factor</i>
PKC-1	<i>3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1</i>
PECAM-1	<i>platelet/endothelial cell adhesion molecule-1</i>
PH-Domäne	Pleckstrin-Homologie-Domäne
PHLPPα	<i>PH domain leucine-rich repeat protein phosphatase α</i>
PI3Ks	Phosphoinositid-3-Kinasen

PIP ₃	Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat
PIWI	<i>P-element-induced wimpy testis</i>
PKA	Proteinkinase A
PKB	Protein Kinase B
PKCβII	Proteinkinase C βII
PLCβ	Phospholipase Cβ
PP2A	<i>protein phosphatase 2A</i>
pre-miRNA	<i>precursor micro RNA</i>
PtdIns	Phosphatidylinositol
PTEN	<i>(phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10)</i>
Rac	<i>ras-related C3 botulinum toxin substrate</i>
Ras	<i>rat sarcoma viral oncogene homolog</i>
Rho	<i>ras homologue</i>
RISC	<i>RNA-induced silencing complex</i>
RNAi	<i>RNA interference</i>
ROCK	<i>Rho-associated, coiled-coil containing kinase</i>
S1P	Sphingosin-1-Phosphat
SH2	<i>sarcoma homology 2</i>
SHIPs	<i>SH2 domain-containing inositol 5-phosphatases</i>
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
TRAF1/2	<i>TNF receptor associated factor 1/2</i>
TSC	<i>tuberous sclerosis complex</i>
VASP	<i>vasodilator-stimulated phosphoprotein</i>
VE-Cadherin	<i>vascular endothelial calcium adhering protein</i>
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
WASP	<i>Wiskott-Aldrich syndrome protein</i>

6.2 Veröffentlichung der Ergebnisse dieser Arbeit

Publikation

R. Heller, Q. Chang, G. Ehrlich, S. N. Hsieh, S. M. Schoenwalder, P. Kuhlencordt, K. T. Preissner, E. Hirsch, R. Wetzker. Overlapping and distinct roles for PI3K β and γ isoforms in S1P-induced migration of human and mouse endothelial cells. Cardiovascular Research (2008); Online-Vorabveröffentlichung, doi:10.1093/cvr/cvn159

Publikationen in Tagungsbänden

Q. Chang, S. N. Hsieh, G. Ehrlich, R. Wetzker, R. Heller. Involvement of PI3K γ in sphingosine 1-phosphate-mediated motility of endothelial cells. In: H. Heinle, H. Schulte, A. von Eckardstein (Herausgeber): Stoffwechsel und Modifikation von Lipiden und Lipoproteinen. 19. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Arterioskleroseforschung 2005. Deutsche Gesellschaft für Arterioskleroseforschung (2006); 200-4

G. Ehrlich, Q. Chang, R. Wetzker, R. Heller. Role of PI3K β in sphingosine 1-phosphate-mediated signaling in endothelial cells. In: H. Heinle, H. Schulte, A. von Eckardstein (Herausgeber): Neue Konzepte, Risikofaktoren und Targets bei Arteriosklerose. 20. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Arterioskleroseforschung 2006. Deutsche Gesellschaft für Arterioskleroseforschung (2007); 86-90

Vorstellung der Daten in Konferenzen

Poster:

Q. Chang, S.N. Hsieh, G. Ehrlich, R. Wetzker, R. Heller. Involvement of PI3K γ in sphingosine 1-phosphate-mediated motility of endothelial cells. 19. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Atheroskleroseforschung. Blaubeuren, Ulm, Germany, 10.3.-12.3.2005.

R. Heller, Q. Chang, G. Ehrlich, S.N. Hsieh, S. M. Schoenwalder, T. Ruckle, C. Rommel, P. Kuhlencordt, E. Hirsch, R. Wetzker. PI3K β and PI3K γ control motility of endothelial cells induced by sphingosine 1-phosphate. PI 3-kinase Signaling Pathways in Disease. Santa Fe, New Mexico, U.S.A., 15.2.-20.2.2007

Vortrag:

Q. Chang, G. Ehrlich, SP. Jackson, R. Wetzker, R. Heller. The phosphatidylinositol 3-kinase β isoform regulates sphingosine 1-phosphate-induced Akt-activation and motility in endothelial cells. 20. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Atheroskleroseforschung. Blaubeuren, Ulm, Germany, 16.3-18.3.2006.

6.3 Danksagung

Herrn Prof. Dr. Reinhard Wetzker danke ich besonders für die Anregung zur Beschäftigung mit der S1P-induzierten Signaltransduktion in HUVEC und die Möglichkeit, dieses Projekt am Institut für Molekulare Zellbiologie der FSU Jena durchführen zu können. Seine Zuversicht und sein Optimismus wirkten immer ermutigend.

Mein ganz herzlicher Dank gilt Frau Prof. Dr. Regine Heller. Ihre intensive Betreuung durch regelmäßige Diskussionen über theoretische und methodische Aspekte der Arbeit hat wesentlich zum Gelingen des Projektes beigetragen. Ich danke ihr für die engagierte Förderung und das Vertrauen in meine Arbeit. Sie hat geholfen, das Ziel nicht aus den Augen zu verlieren und auch schwierige Situationen zu bewältigen.

Ich danke vor allem auch meiner chinesischen Mitdotorandin Qing Chang für die enge Zusammenarbeit und Unterstützung bei unserem gemeinsamen Projekt, insbesondere für die Durchführung des tierexperimentellen Teilprojektes. Nadine Stahmann danke ich für den anregenden wissenschaftlichen Gedankenaustausch.

Vielen Dank auch an Gunda Guhr, die für eine hervorragende Labororganisation gesorgt hat und mir viele hilfreiche Tips und Tricks bei der praktischen Durchführung der Experimente vermittelt. Ebenso bedanke ich mich bei Elke Teuscher, die mich während der gesamten Zeit zuverlässig mit den benötigten HUVEC versorgt hat. Außerdem danke ich Dr. Siegfried Krause und Dana Kürsten für die gute Zusammenarbeit und angenehme Arbeitsatmosphäre.

Ich bedanke mich auch bei all denen Kollegen am Institut für Molekulare Zellbiologie, die mir durch wissenschaftliche Diskussionen, moralische Unterstützung oder Bereitstellung von benötigten Materialien geholfen haben.

Nicht zuletzt möchte ich meinen Eltern und insbesondere meiner Lebensgefährtin Diane Schulz für ihre beständige Geduld und Unterstützung, das entgegengebrachte Verständnis und ihren moralischen Beistand in schwierigen Phasen danken.

6.4 Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, daß ich die vorliegende Arbeit selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel und Literatur angefertigt habe. Es wurden keine Textabschnitte eines Dritten ohne Kennzeichnung übernommen.

Ich versichere, daß ich weder diese Arbeit noch eine in wesentlichen Teilen ähnliche Abhandlung bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe. Ebenso habe ich die Disseration nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht. Die Hilfe eines Promotionsberaters wurde von mir nicht in Anspruch genommen. Dritte haben von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit der vorgelegten Dissertation stehen. Die Promotionsordnung der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät ist mir bekannt.

Jena, 29.05.2009

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Jule Erlein". The signature is written in a cursive, flowing style.

6.5 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Gunter Ehrlich
Geburtsdatum	23. September 1974
Geburtsort	Jena
Familienstand	ledig, zwei Kinder
Wohnort	Sankt-Jakob-Str. 37, 07743 Jena

Ausbildung

29.06.1993	Abitur, Staatliches Gymnasium „Albert Schweitzer“, Jena, Note 1,8
11/1993 – 10/1994	Zivildienstleistender, Klinikum der Friedrich-Schiller-Universität (FSU) Jena
10/1994 – 08/1999	Biochemiestudent, FSU Jena
12/1998 – 08/1999	Diplomand, Institut für Virologie der FSU Jena; Thema „ <i>In-vitro</i> -Mutagenese zur Inaktivierung der Interleukin-10-Aktivität rekombinanter Cocksackieviren“
06.09.1999	Diplom-Biochemiker, Gesamtnote 1,3

Beruflicher Werdegang

09/1999 – 02/2002	Wissenschaftlicher Mitarbeiter, Jena BioScience GmbH, Jena
03/2002 – 07/2008	Doktorand, Institut für Molekulare Zellbiologie der FSU Jena
08/2008 – 11/2008	Fertigstellung der Dissertation

Jena, 28.05.2009

